

Polymalataseabhängigkeit des Transports von Polymalat in *Physarum polycephalum*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Anton Brandmaier
aus Kolbermoor

Regensburg, 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 06.04.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Holler

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. Oberprieler (Vorsitzender)
Prof. Dr. Holler
Prof. Dr. Schneuwly
Prof. Dr. Förster

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Organismus Physarum polycephalum	1
1.1.1 Systematik	1
1.1.2 Lebenszyklus von Physarum polycephalum	2
1.1.3 Plasmodium und Plasmaströmung	4
1.2 Polymalat (PMLA)	5
1.2.1 Vorbemerkung	5
1.2.2 Struktur, chemische und biochemische Eigenschaften	5
1.3 β -Poly(L-Malat)-Hydrolase (Polymalatase)	6
1.4 Genomische DNA-Sequenz und cDNA-Sequenz von Polymalatase	8
1.5 Zielsetzung	13
2 Material	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Geräte	17
2.3 Enzyme und Antikörper	19
2.4 Kit-Systeme	20
2.5 Medien	21
2.5.1 Nährmedien für Physarum polycephalum	21
2.5.2 Medien für E. coli	22
2.6 Puffer und Lösungen	24
2.6.1 Allgemeine Puffer	24
2.6.2 Lösungen für Arbeiten mit DNA	24
2.6.3 Lösungen für Arbeiten mit RNA	25

2.6.4	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	25
2.6.4.1	Lösungen für SDS-PAGE	25
2.6.4.2	2 x SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970)	26
2.6.4.3	Lösungen für das Western-Blotting	26
2.6.5	Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion	27
2.6.6	Stammlösungen der Antibiotika	27
2.6.7	Lösungen für den Zellaufschluß	28
2.6.8	Lösungen für den Export von Polymalat und Polymalatase	28
2.7	Organismen	29
2.7.1	Physarum polycephalum	29
2.7.2	Bakterienstämme	29
2.8	Vektoren	30
2.8.1	pET-Vektoren zur Genexpression in Escherichia coli	30
2.8.2	pUC 19	32
2.9	Oligonukleotide	33
2.10	DNA- und Protein-Standards	34
2.10.1	DNA-Standard	34
2.10.2	Protein-Standard	35
3	Methoden	36
3.1	Anzucht	36
3.1.1	Anzucht von Physarum polycephalum	36
3.1.1.1	Anzucht von Mikroplasmodien des Stammes M ₃ CVII	36
3.1.1.2	Anzucht von Mikroplasmodien des Stammes LU 887	36
3.1.1.3	Anzucht von Makroplasmodien	37
3.1.2	Anzucht von E. coli-Stämmen DH 10 B, DH 5 α und JM 109	37
3.2	Transformation von E. coli-Stämmen	38
3.2.1	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen	38
3.2.2	Transformation von chemisch kompetenten E. coli-Zellen	38

3.2.3	Blau-Weiß-Selektion	39
3.3	Ernte und Zellaufschlüsse	39
3.3.1	Ernte von Mikroplasmodien	39
3.3.2	Zellaufschlüsse	40
3.3.2.1	Rohextraktpräparation bei Makroplasmodien	40
3.3.2.2	Fraktionierter Zellaufschluß	40
3.3.2.3	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zur Membranisolierung	41
3.3.2.3.1	Herstellung eines Dichtegradienten	41
3.3.2.3.2	Membranisolierung und Ultrazentrifugation	42
3.3.2.3.3	Detektion der membranhaltigen Fraktion	42
3.4	Arbeiten mit RNA	43
3.4.1	Reinigung von Gesamt-RNA aus Mikroplasmodien	43
3.4.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	43
3.4.3	Reverse Transkription	44
3.5	Arbeiten mit DNA	45
3.5.1	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli (Miniprep)	45
3.5.2	Reinigung von DNA	46
3.5.2.1	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	46
3.5.2.2	Reinigung von DNA aus Agarose-Gel	46
3.5.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	46
3.5.4	Agarosegelelektrophorese	47
3.5.5	Restriktionsverdau	47
3.5.6	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	48
3.5.7	Ligation	48
3.5.7.1	Ligation an glatten Enden	49
3.5.7.2	Ligation an überhängenden Enden	49
3.5.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.5.9	DNA-Sequenzierung	51
3.6	Proteinchemische Methoden	52

3.6.1	Proteinproduktion	52
3.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	53
3.6.3	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	55
3.6.3.1	Coomassiefärbung (Hames, 1990)	55
3.6.3.2	Silberfärbung (Heukeshoven & Dernik, 1988)	55
3.6.4	Western-Blotting	57
3.6.5	Proteinbestimmung nach Bradford	58
3.7	Standardisierung der Meßmethode	59
3.8	Ernte und Waschung bei Exportversuchen	60
3.9	Enzymatische Tests	60
3.9.1	Quantitative Bestimmung von L-Malat	60
3.9.2	Quantitativer Nachweis von PMLA	62
3.9.3	Test auf PMLA-Hydrolase (Polymalatase-Aktivität)	62
3.10	Bestimmung der Überlebensrate von Mikroplasmodien bei der Exportmessung	63
3.10.1	Vorbemerkung	63
3.10.2	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Auszählung (Trypanblau)	63
3.10.3	Ermittlung der Überlebensrate mit Hilfe der photometrischen Bestimmung des ausgelaufenen Pigments	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Exportkinetik von Polymalat und Polymalatase bei Mikroplasmodien mit unterschiedlichen Beleuchtungen	65
4.1.1	Zielsetzung	65
4.1.2	Export von Polymalat bei Mikroplasmodien des Stammes M ₃ CVII mit unterschiedlichen Beleuchtungen	65
4.1.2.1	Strategie	65
4.1.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	66
4.1.2.3	Messung des gelben Farbstoffes im Überstand	67

4.1.2.4	Export von Polymalat nach Grün-Weiß-Grün-Beleuchtung	68
4.1.3	Export von Polymalat bei Mikroplasmodien des Stammes LU 887 mit unterschiedlichen Beleuchtungen	69
4.1.3.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	69
4.1.3.2	Export von Polymalat mit unterschiedlichen Beleuchtungen	70
4.2	Malatgehalt von weißen und gelben Mikroplasmodien	72
4.3	Einfluß von Proteaseinhibitoren auf den Export von Polymalat und Polymalatase	75
4.3.1	Zielsetzung	75
4.3.2	Bestimmung der optimalen Hemmkonzentration	76
4.3.3	Aktivität von Polymalatase im Überstand nach Zugabe von Proteaseinhibitorcocktail	77
4.3.4	Export von Polymalat nach Zugabe von Proteaseinhibitoren	78
4.4	Export bei Makroplasmodien	79
4.4.1	Entwicklung eines geeigneten Versuchssystems für den Export bei Makroplasmodien	79
4.4.2	Export von Polymalatase mit und ohne Injektion von Polymalat in Makroplasmodien von M ₃ CVII und LU 887	80
4.4.2.1	Zielsetzung	80
4.4.2.2	Exportkinetiken für Plasmodien der Stämme M ₃ CVII und LU 887 ohne Injektion	81
4.4.2.3	Exportkinetiken für Plasmodien der Stämme M ₃ CVII und LU 887 nach Injektion	82
4.5	Aktivierung von Polymalatase mit MgATP in der Membranfraktion	85
4.6	Herstellung eines Antikörpers für Polymalatase	86
4.6.1	Vorbemerkung	86
4.6.2	Epitopanalyse	87
4.6.3	Immunisierung	88
4.7	Intrazellulärer und extrazellulärer Nachweis von Polymalatase	89
4.7.1	Polymalatase in der Membran	89

4.7.2	Polymalatase im Kulturüberstand	91
4.7.3	Polymalatase in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer	91
4.8	Klonierung des Polymalatase-Gens	93
4.8.1	Vorbemerkung	93
4.8.2	Isolierung des Polymalatase-Gens aus <i>Physarum polycephalum</i> und Klonierung in pUC 19 Vektor	93
4.8.2.1	Klonierungsversuch mit verschiedenen Primern in pUC 19 Vektor	93
4.8.2.2	Weitere Klonierungsversuche im pUC 19- und Hefeexpressionsvektor pAM 81	94
4.9	Expression des Polymalatase-Gens in pET 24 a (+) Vektor	96
4.9.1	Vorbemerkung	96
4.9.2	Klonierung mit dem Primerpaar PMLA-Nhe I und PMLA-Not I in pUC 19 Vektor	96
4.9.3	Klonierung des Polymalatase-Gens in pET 24 a (+) Vektor	98
4.9.4	Expression von Polymalatase (Fragment 5) im analytischen Maßstab mit anhängenden Histidin-Resten	100
4.9.4.1	Produktion von Polymalatase (Fragment 5) mit und ohne IPTG	100
4.9.4.2	Isolierung von Polymalatase in Gegenwart von Proteaseinhibitorcocktail	101
4.9.4.3	Immunologische Detektion des Proteins mit Hilfe von Antikörpern gegen Histidin-Reste	102
4.9.5	Versuche zur Aktivierung von rekombinant hergestellter Polymalatase (Fragment 5)	104
4.9.5.1	Aktivitätsmessungen von Polymalatase (Fragment 5)	104
4.9.5.2	Aktivierungsversuche von Polymalatase (Fragment 5) mit Hilfe der Membranfraktion	105
4.9.5.3	Aktivierung von Polymalatase (Fragment 5) durch Mg-ATP	105
4.10	Bestimmung des Polymalatgehalts von Makroplasmodien nach Knock-down des Polymalatase-Gens	106
4.10.1	Vorbemerkung	106

4.10.2	Polymalatgehalt der Membranfraktion nach Injektion von dsRNA	107
	Polymalatase	
4.10.3	Export von Polymalat nach Injektion von siRNA	108
5	Diskussion	110
5.1	Einführende Bemerkung	110
5.2	Einfluß unterschiedlicher Beleuchtungen auf den Export von Polymalat und Polymalatase bei Mikroplasmodien	111
5.3	Untersuchungen mit dem monospezifischen Antikörper gegen Polymalatase	112
5.4	Herstellung der rekombinanten Polymalatase	114
5.5	Zusammenhang zwischen Polymalatexport und Polymalatase	116
5.6	Ausblick	118
6	Zusammenfassung	120
	Literaturverzeichnis	XIV
	Anhang	XX

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	(volume/volume)
(w/v)	(weight/volume)
°C	Grad-Celsius
abs.	absolut
AgNO ₃	Silbernitrat
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bidestd.	2fach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAM	Chloramphenicol
cDNA	Komplementäre DNA
CH ₃ COOH	Essigsäure
CIA	Cloroform-Isoamylalkohol
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N, N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Desoxyribonukleotid (N = A; T; C; G)
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat

E. coli	Escherichia coli
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether) N, N, N', N'-Tetraacetat
ER	Endoplasmatische Reticulum
et al.	et alii
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
Ig G	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthio- β -galaktosid
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄ x	Kaliumdihydrogenphosphat
k _m	Michaelis-Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molar
mA	Milliampere
mcs	multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	main histon komplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MnSO ₄	Mangansulfat
mRNA	Messenger-RNA

N	Normal
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NAAG	N-Acetyl-L-Aspartat-L-Glutamat
NAALADase	N-acetylated-alpha-linked acidid dipeptidase
NaCl	Natriumchlorid
NADH/H ⁺ , NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Proteaseinhibitorcocktail
PMLA	Polymalat
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
pNP	p-Nitrophenol
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TLCK	N-Tosyllysinchloromethylketon
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan

ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated Region
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -Galaktosid
z. B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnSO ₄	Zinksulfat
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol

1 Einleitung

1.1 Organismus *Physarum polycephalum*

1.1.1 Systematik

Physarum polycephalum (griechisch; vielköpfiger Blasenstäubling) ist ein Vertreter der Ordnung Myxomycota, der echten Schleimpilze. Die Schleimpilze sind eukaryontische Mikroorganismen die phänotypische Ähnlichkeiten sowohl mit den Pilzen als auch mit den Protozoen aufweisen. Innerhalb der Eukarya gibt es drei Gruppen, die zu den Schleimpilzen gerechnet werden. Sie untergliedern sich in die Myxogastria (echte bzw. plasmodiale Schleimpilze), in die Acrasiomycota (zelluläre Schleimpilze, z. B. *Dictyostellum*) und die Protostelia.

Nachfolgende Tabelle zeigt die phylogenetische Einordnung von *Physarum polycephalum* (Aldrich et al., 1982 a; Sitte, 1998)

Abteilung	<i>Myxomycota (echte bzw. plasmodiale Schleimpilze)</i>
Klasse	<i>Myxogastria</i>
Unterklasse	<i>Myxogastromycetidae</i>
Ordnung	<i>Physarales</i>
Familie	<i>Physaraceae</i>
Gattung	<i>Physarum</i>
Art	<i>Physarum polycephalum</i>

Tabelle1: Phylogenetische Einordnung von *Physarum polycephalum* nach Aldrich & Daniel (1982 b) und Sitte (1998)

Sowohl Monophylie als auch phylogenetische Position der Schleimpilze als Organismengruppe sind aufgrund divergierender molekularer Daten umstritten. So wur-

den in der Vergangenheit die Myxomyceten näher zu den Fungi und Pflanzen stehend gesehen, später erfolgte eine Zuordnung zu den Protisten (Sitte, 1998).

In neuerer Zeit lassen sich mehr Indizien finden, die eine gleichberechtigte Einordnung neben Fungi, Pflanzen und Tieren sinnvoll erscheinen lassen. Die meisten Daten sprechen derzeit für eine Monophylie der Schleimpilze (Baldauf & Doolittle, 1997).

1.1.2 Lebenszyklus von *Physarum polycephalum*

Im Lebenszyklus von *Physarum polycephalum* unterscheidet man eine haploide und eine diploide Lebensphase. Abbildung 1 zeigt den Lebenszyklus von *Physarum polycephalum*.

In der Natur existiert *Physarum polycephalum* hauptsächlich als diploides Plasmodium und als haploide Myxamöbe. Das diploide Plasmodium (1) ist die wichtigste vegetative Phase. Plasmodien sind zelluläre Einheiten, die Millionen von Kernen enthalten. Diese teilen sich im 8 bis 9 Stunden Rhythmus synchron ohne Zellteilung. Die Versorgung mit Nährstoffen und die Verteilung von Stoffen werden durch die Plasmaströmung in den Adern gewährleistet.

Nahrungsmangel und Lichteinwirkung führen zur Induktion der Sporulation (2). Daraufhin bilden sich aus Plasmodien Sporangien (3) und nach Meiose haploide Sporen (4).

Durch Sporenkeimung entstehen unter günstigen Umweltbedingungen einkernige Myxamöben (5 und 6), die sich durch Mitose unter Zellteilung vermehren. Sie stellen die Gameten im Lebenszyklus von *Physarum polycephalum* dar.

Abhängig von Umweltbedingungen wandeln sich Myxamöben in Zysten (6 a) oder Flagellaten (6 b) um oder sie können fusionieren (7). Wenn zwei Amöben unterschiedlichen Paarungstyps miteinander verschmelzen, entsteht eine diploide Zygote (8). Aus dieser diploiden Zelle entsteht durch synchrone Kernteilung ohne weitere Zellteilung wieder ein Plasmodium (9), das sich auf festem Untergrund und geeigneten Nahrungsquellen zu einem Makroplasmodium entwickelt.

Man unterscheidet zwischen Mikroplasmodien (10) und Makroplasmodien. Makroplasmodien sind Riesenzellen, die bis zu einer Größe von 50 cm Durchmesser auf einer geeigneten Oberfläche anwachsen können. In Submerkultur bilden sich durch die Einwirkung von Scherkräften beim Schütteln Mikroplasmodien mit einer Größe von 0,25 - 3 mm.

Unter Nahrungsmangel im Dunkeln entwickeln sich aus Plasmodien multinukleare Sklerotien bzw. Spherulen (11) als widerstandsfähige Dauerform. Da Plasmodien unter Wiederherstellung von geeigneten Bedingungen sich aus Spherulen entwickeln, wird diese diploide latente Lebensform für die Herstellung von Dauerkulturen verwendet.

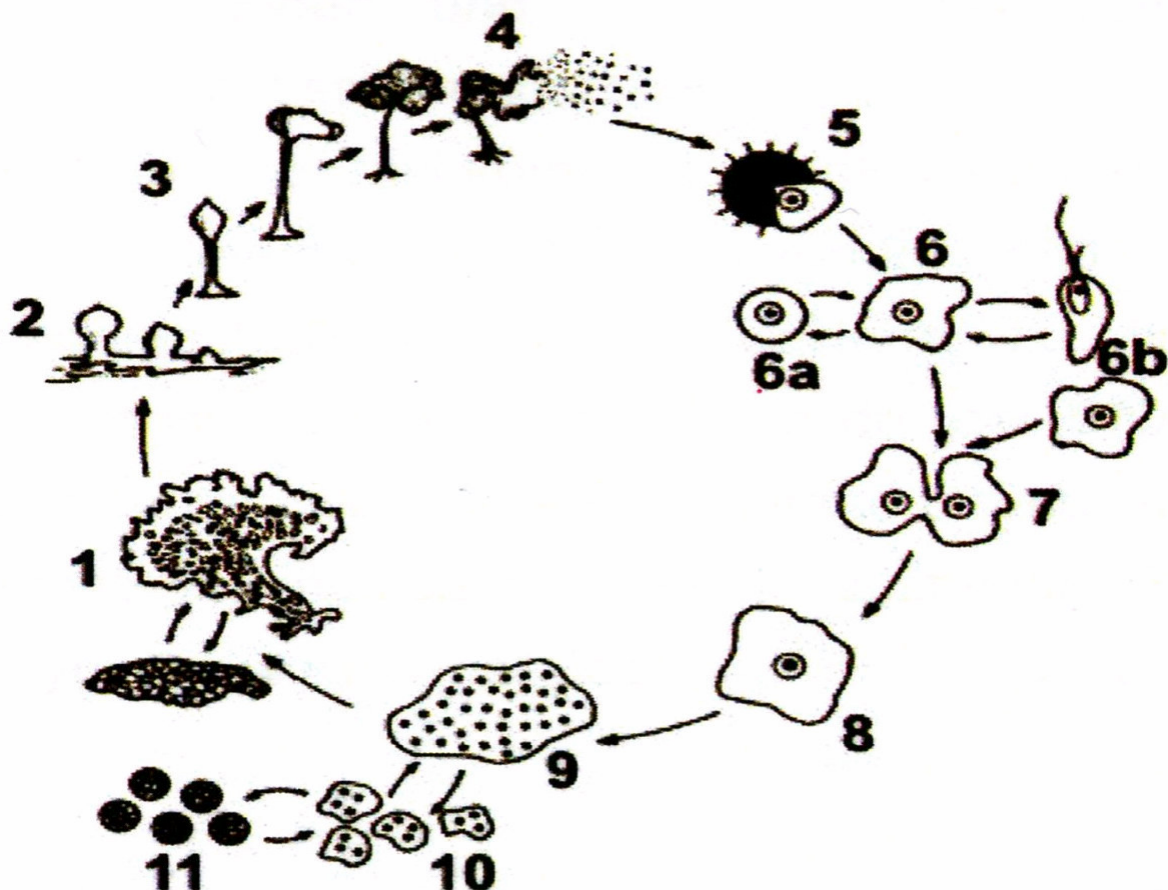


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Physarum polycephalum* (modifiziert nach Hüttermann, 1973)

Die Synthese von Polymalat findet nur in Plasmodien statt. In allen anderen Lebensstadien wie in Sklerotien bzw. Spherulen, in Sporen, in Amöben und in Flagellaten sowie in deren Dauerformen, den Cysten, ist Polymalat nicht nachweisbar (Holler et al., 1992 a).

1.1.3 Plasmodium und Plasmaströmung

Die natürliche Heimat von *Physarum polycephalum* sind die feuchtwarmen Wälder in den Tropen und Subtropen. Die auffällig gelb gefärbten Plasmodien (Kapitel 1.1.2) leben vorwiegend auf modrigem Holz unter Lichtausschluß. Ihre Nahrung stellt totes oder lebendes organisches Material, z.B. Bakterien dar, die durch Phagozytose aufgenommen werden. Die negativ phototaktischen Plasmodien gelangen durch chemische Reizwirkungen zum geeigneten Substrat. An der Fortbewegung ist ein Myosin I ähnliches Protein beteiligt. Die Form der Plasmodien ist variabel, da sie nicht von einer festen Zellwand umgeben sind.

Im Zellinneren können sich bis zu 10^9 Kerne befinden. Diese entstehen durch synchrone mitotische Teilungen. Eine starke Plasmaströmung ist für die Transport- und Verteilungsaufgaben in der großen Zelle verantwortlich. Diese Strömung kann im Phasenkontrastmikroskop innerhalb von so genannten Adern beobachtet werden, die ein Makroplasmodium durchziehen. Am wachsenden Rand des Plasmodiums werden die Kanäle immer enger und zeigen eine zunehmende Verzweigung. Einige Kanäle breiten sich ringförmig um das Zentrum aus. Die Plasmaströmung besitzt eine Geschwindigkeit von etwa 1 $\mu\text{m}/\text{sek}$ und kehrt ihre Richtung etwa jede Minute um (Kamiya, 1959).

Die Strömung wird durch eine regelmäßige Oszillation des Plasmodiums hervorgerufen. Es handelt sich dabei um Zyklen von Kontraktion und Relaxation mit einer Dauer von etwa 2 - 3 min (Ishigami, 1986). Für die Oszillation wiederum ist der Auf- und Abbau von Fibrillen oder Mikrofilamentbündeln aus Actomyosin verantwortlich. Der Auf- und Abbau von Filamentbündeln wird hauptsächlich an der Peripherie des Plasmodiums (anterior region) und weniger im Zentrum (posterior

region) beobachtet. Sobald sich das Plasmodium zusammenzieht, bildet sich an der Peripherie ein dichtes Netzwerk aus Fibrillen, das sich beinahe komplett auflöst, sobald die Relaxationsphase beginnt. Die parallelen Microfilamentbündel im Zentrum werden dagegen kaum abgebaut. Die Strömung wird durch Unterschiede des lokalen inneren Drucks generiert, die durch Oszillation entstehen.

Makroplasmodien und ihre Plasmaströmung ermöglichen es, gezielt Substanzen durch Injektion in ihre Adern einzubringen und ihren Einfluß auf Polymalat und Polymalatase zu untersuchen.

1.2 Polymalat (PMLA)

1.2.1 Vorbemerkung

β -Poly(L-Malat) stellt ein Polyester dar, dessen monomerer Baustein Äpfelsäure ist. Dieses Polymer wurde erstmals 1969 von Shimada in Kulturüberständen von *Penicillium cyclopium* entdeckt und als Inhibitor von sauren Proteasen identifiziert (Shimada et al., 1969). Auch in anderen Organismen wie *Cladosporium* und *Corollospora* wurde Polymalat gefunden (Rathberger et al., 1999). Ebenfalls im Kulturüberstand von *Aureo-basidium sp.*, einer schwarzen Hefe, wurde im Jahr 1993 niedermolekulares Polymalat (Nagata et al., 1993) nachgewiesen.

Im Jahr 1987 wurde in *Physarum polycephalum* Polymalat gefunden. In Plasmodien und in deren Kulturüberständen wurde eine hochmolekulare Art gefunden und als spezifischer Inhibitor von DNA-Polymerase α identifiziert (Fischer et al., 1989).

1.2.2 Struktur, chemische und biochemische Eigenschaften

Der monomere Baustein L-Malat (L-Äpfelsäure) besitzt zwei funktionelle Carboxylgruppen, die prinzipiell in die Bildung verschiedener Polyestertypen (α -Typ, β -Typ und

$\alpha\beta$ -Typ) eingehen können. Unter physiologischen Bedingungen liegen die Carboxylatgruppen von Polymalat deprotoniert vor. Es handelt sich also um ein stark negativ geladenes Polyanion.

Natürliches Polymalat ist ein linearer Polyester vom β -Type (Cammass et al., 1993). Die Molmasse liegt im Bereich zwischen 20 und 400 kDa mit einem Hauptanteil bei 50 kDa (Abbildung 2).

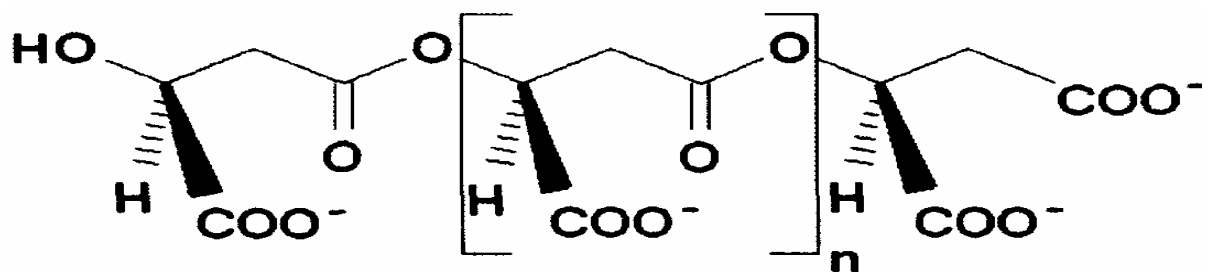


Abbildung 2: Struktur von β -Poly(L-Malat)

1.3 β -Poly(L-Malat)-Hydrolase (Polymalatase)

Bei β -Poly(L-Malat)-Hydrolase (Polymalatase) handelt es sich um eine Polymalat abbauende Esterase, die hydrolytisch Polymalat in Malatbausteine zerlegt (Abbildung 3).

Ein Abbau von L-Polymalat bis zum Monomer verläuft unter nicht sehr extremen pH-Werten und bei Raumtemperatur sehr langsam. Außer Polymalat besitzt kein anderes Polymer Substrateigenschaften. Die Aktivität von β -Poly(L-Malat)-Hydrolase (Polymalatase) konnte zuerst bei *Physarum polycephalum* gezeigt werden (Windisch et al., 1992; Korherr et al., 1995).

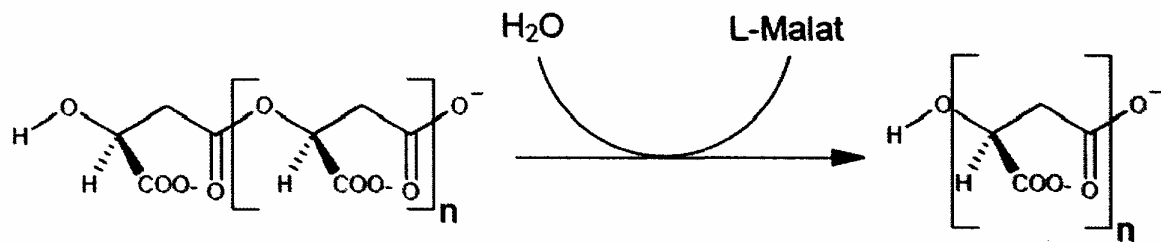


Abbildung 3: Hydrolyse von Polymalat durch Polymalatase

Das Enzym konnte sowohl aus 5 Tage alten Plasmodien-Kulturüberständen als auch aus Cytoplasmaextrakten von Plasmodien angereichert und gereinigt werden (Korherr et al., 1995).

Es zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: Die Polymalatase-Aktivität aus dem Kulturmedium und dem Plasmodienextrakt kann auf ein 68 kDa glykosyliertes Protein (p68) zurückgeführt werden. Bei p68 handelt es sich um ein proteolytisches Fragment eines ebenfalls glykosylierten Proteins p97. Das Protein p97 weist sowohl qualitativ als auch quantitativ gleichwertige Polymalatase-Aktivität wie das Protein p68 auf (Karl und Holler, 1998). Bei der Entfernung der Zuckerreste des 97 kDa-Proteins verringert sich die Molekularmasse um etwa 10 kDa. Polymalatase (p68 und p97) spaltet ausgehend vom Hydroxylende einzelne L-Malatmoleküle bis zur vollständigen Hydrolyse von PMLA ab.

Das Aktivitätsmaximum von Polymalatase liegt bei 27 °C und pH 3,5 (Korherr et al., 1995). Bei steigendem pH-Wert sinkt der K_m -Wert auf 4,2 mM (Konzentration bezogen auf L-Malylreste im β -L-PMLA). Die spezifische Aktivität liegt bei 9,0 μ mol freigesetztem L-Malat pro min und mg Protein (pH 4,5, 27 °C).

Inhibierend wirken N-Bromsuccinimid, Mercuribenzoat und D-Gluconolacton. Des Weiteren hemmen Salze wie KCl, CaCl_2 und ZnCl_2 . Bei sehr hohen Konzentrationen hemmen Ethylendiamintetraessigsäure, Mercaptoethanol, Saccharose und Glycerin. Inhibitoren für Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen zeigen ebenso wie verschiedene synthetische Polyanionen keine Wirkung. Spermin komplexiert β -L-PMLA. In kleinen

Konzentrationen (0,3 mM) steigert es die Aktivität um den Faktor 2. Mit p-Nitrophenolderivaten von aliphatischen Carbonsäuren und Monosacchariden findet man keine Esterase- oder Glucosidasenaktivitäten. Insgesamt gesehen besitzt Polymalatase mehr Gemeinsamkeiten mit Glucosidasen als mit Estereasen (Korherr et al., 1995).

Polymalatase wird wie Polymalat sowohl bei Mikroplasmodien als auch bei Makroplasmodien ins Medium exportiert. Versuche mit Brefeldin A, das den Export von Stoffen über den Golgi-Apparat hemmt, zeigten die Beteiligung des Golgi-Apparates am Zustandekommen der Aktivierung von Polymalatase.

Ein weiteres Indiz für diesen Exportweg ist das Vorhandensein eines N-terminalen Signalpeptides, das allgemein für die Synthese von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum (ER) verantwortlich ist (Reiter, 2003).

1.4 Genomische DNA-Sequenz und cDNA-Sequenz von Polymalatase

Die Gesamtlänge der genomischen Sequenz des Gens von Polymalatase beträgt 9371 bp. Davon befinden sich insgesamt 2163 bp in kodierten Bereichen (transkriptierter Bereich ohne Introns, 5'-UTR und 3'-UTR) und 7208 bp im nicht – kodierenden Bereich, wobei 1469 bp auf den Promotorbereich entfallen. Das Gen besteht aus 23 Exons und 22 Introns.

Die berechnete Intron-Dichte liegt mit einem Wert von 2,7 Introns pro 1000 bp genomischer Sequenz an der unteren Grenze im Vergleich zu den Durchschnittswerten von 4,9 pro 1000 bp bisher untersuchter Gene bei *Physarum polycephalum* (Trzcinska-Danielewicz et al., 2000). In Abbildung 4 ist zu erkennen, daß mit Ausnahme von Intron 1 und Intron 17 die Introns immer größer sind als das von ihnen eingegrenzte Exon. Das mit Abstand größte Intron Nummer 22 mit 766 bp ist das letzte Intron vor dem Exon Nummer 23. Die Position des größten Introns am 3'-Ende stimmt mit Daten von *Physarum polycephalum* (Trzcinska-Danielewicz et al., 2000) und anderen Organismen überein (Boeke et al., 1999).

Zwischen Position 4080 und 4134 findet sich ein Bereich, in dem 16 Kopien eines 4 bp langen tandem repeat (CACT) zu finden sind. Dabei handelt es sich um eine Mikrosatellitensequenz, die unter anderen in Organismen wie bei der Hausmaus (*mus musculus*) oder dem Zebrafisch (*danio rerio*) gefunden wurde.

Daneben finden sich drei direkte Sequenzwiederholungen (direct repeats). Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau der genomischen und der cDNA-Sequenz.

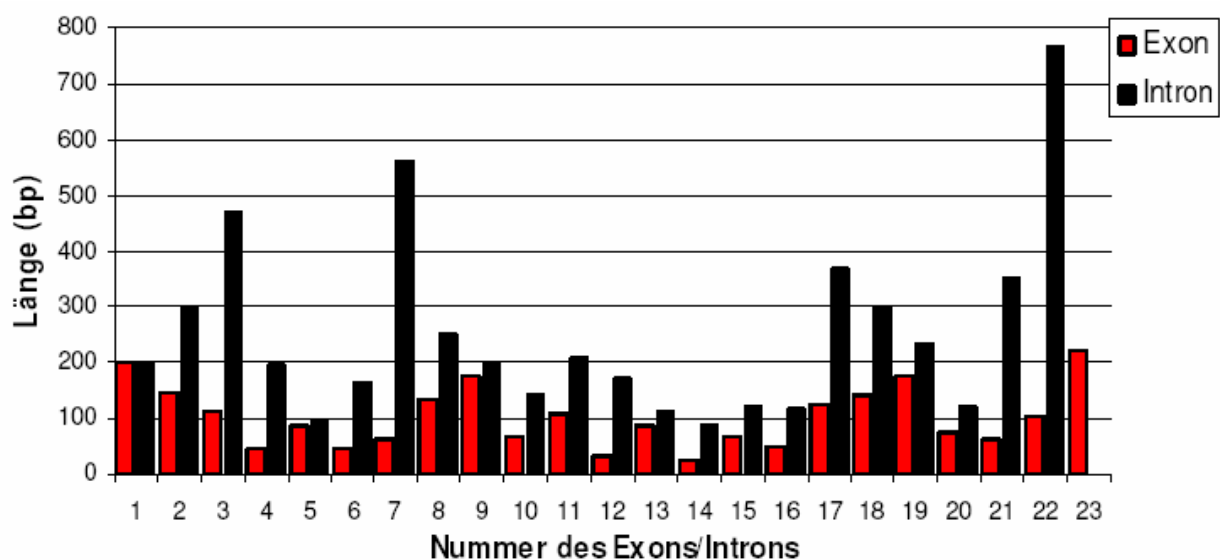


Abbildung 4: Schematische Darstellung von genomischer Sequenz und cDNA-Sequenz des Polymalataze-Gens. Exons sind durch rote Kästchen dargestellt und mit der entsprechenden Nummer versehen. Introns sind mit einem schwarzen Strich gekennzeichnet (Haindl, 2004).

Der GC-Gehalt der gesamten genomischen Sequenz liegt bei 38,2 %. Der GC-Gehalt des kodierenden Bereichs beträgt 47,4 % und der GC-Gehalt des nichtkodierten Bereichs 35,5 %. Die Differenz bezüglich des GC-Gehalts beider Bereiche beträgt 13,6%. Dies stimmt mit Daten überein, die man durch den Vergleich von 14 unabhängigen Genen in *Physarum polycephalum* gewonnen hat (Trzcinska-Danielewicz et al., 2000).

Die aus der cDNA berechnete Aminosäuresequenz von Polymalatase hatte eine Länge von 705 Aminosäuren. Das ergab eine Größe von 76,96 kDa. Der Vergleich der Primärsequenz von Polymalatase mit dem Programm blastp, das auf verschiedene Datenbanken zurückgreift, ergab folgende signifikante Treffer:

Protein	Funktion	Organismus	score (bits)	E-Wert
NAALADase L	Proteolyse	<i>Homo sapiens</i>	234	5,00E-60
Folathydrolase-Homolog	Proteolyse	<i>Gloeobacter violaceus</i>	231	5,00E-59
NAALADase-ähnlich	Proteolyse	<i>Rattus norvegicus</i>	224	7,00E-57
Glutamat-Carboxypeptidase II (früher PSMA)	Zn-abhängige Proteolyse: Folathydrolyse und NAALADase-Aktivität	<i>Rattus norvegicus</i>	214	6,00E-54
NAAG-Peptidase II	Glutamatcarboxypeptidase	<i>Mus musculus</i>	210	8,00E-53
peptidaseartiges Protein	Proteolyse	<i>Arabidopsis thaliana</i>	210	1,00E-52
Glutamat-Carboxypeptidase II	Zn-abhängige Peptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	209	2,00E-52
Transferrin Rezeptor II	Rezeptor für Transferrin	<i>Mus musculus</i>	135	3,00E-30
Transferrin Rezeptor	Rezeptor für Transferrin	<i>Homo sapiens</i>	118	4,00E-25

Tabelle 2: Signifikante Treffer aus der blastp-Suche mit Beschreibung der Funktion. E-Wert = Anzahl der erwarteten Zufallstreffer mit derselben Punktzahl in der vorhandenen Datenbank. Signifikante Treffer zeichnen sich durch niedrige E-Werte aus (Haindl, 2004).

Bei allen Enzymen aus Tabelle 2 handelte es sich um Carboxypeptidasen. Daneben gibt es Homologien zu Transferrinrezeptoren. Das Polymalatase-Gen besitzt konservierte Einzeldomänen oder Protein-Module. Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung von cDNA, Proteinsequenz und konservierten Domänen.

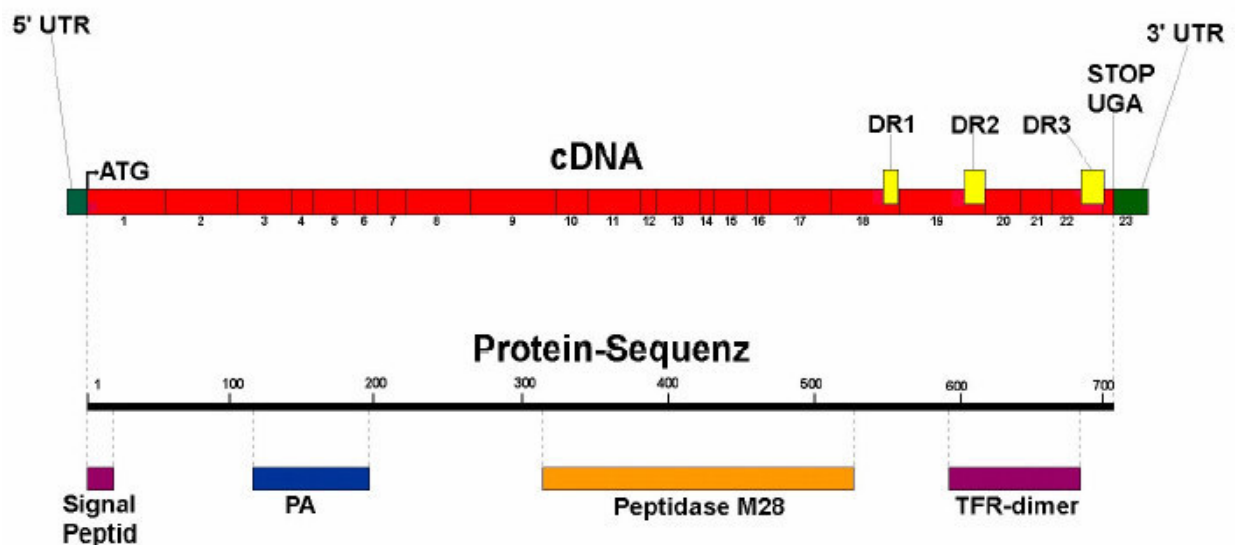


Abbildung 5: Schematische Darstellung von cDNA, Proteinsequenz, konservierten Domänen und der vermutlich translatierten Proteinsequenz der Polymalatase. Unter der Proteinsequenz sind die jeweiligen konservierten Domänen PA, Peptidase M28 und TFR-Dimer dargestellt. Das Signalpeptid (Reiter, 2003) umfaßt die ersten 20 Aminosäuren der Polymalatase (Haindl, 2004).

Es finden sich drei verschiedene konservierte Domänen. Die erste ist eine PA-Domäne (Proteinassoziierte Domäne). Diese wird als Insert-Domäne in verschiedenen Proteasen und unter anderem im Transferrin-Rezeptor gefunden. In einigen Proteinen ist sie für die Bildung struktureller Komplexe über eine Anbindung an andere Proteindo-

mänen, wie z.B. der MHC-I-Domäne oder die ebenfalls in der Sequenz vorhandene TFR-Dimer-Domäne (Transferrin receptor-like dimerisation domain) verantwortlich. Die TFR-Dimer-Domäne spielt eine Rolle bei der Dimerisierung des Transferrin-Rezeptors. Sie findet man auch in anderen Proteinen wie der Glutamat-Carboxypeptidase II und der NAALADase. Die TFR-Dimer-Domäne kann mit sich selbst, mit PA-Domäne oder der MHC I-Domäne eine Bindung eingehen.

Die dritte konservierte Domäne ist die Peptidase M28-Domäne. Diese findet sich in Metallopeptidasen, die zur M28-Familie gehören. Peptidasen dieser Familie enthalten neben der Peptidase M28-Domäne stets auch eine TFR-Dimer-Domäne und eine PA-Domäne.

Einzelne konservierte Domänen in der PA- bzw. der TFR-Dimer-Domäne könnten eine Rolle bei der Interaktion dieser beiden Domänen mit anderen Proteinen bzw. bei einer Di- oder Oligomerisierung spielen.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Rolle Polymalatase beim Transport von Polymalat untersucht werden.

Dazu sollten zuerst die Daten vorangegangener Arbeiten (Brandmaier, 2003) zur Exportkinetik von PMLA und PMLA-Hydrolase (Polymalatase) aus Mikroplasmodien von *Physarum polycephalum* vervollständigt werden. So wurde der Einfluß von Licht verschiedener Wellenlängen auf den Export von Polymalat bei den Stämmen M₃CVII und LU 887 untersucht. Es sollte auch die Frage geklärt werden, ob eine eventuell vorhandene Lichtabhängigkeit des Polymalatexports eine reversible oder irreversible Hemmung darstelle.

Die Stämme M₃CVII und LU 887 unterscheiden sich hinsichtlich ihres Polymalatgehalts und ihres Exportverhaltens auf Polymalat und Polymalatase. Es sollte die Ursache dieses Unterschiedes gesucht werden.

Im Zusammenhang mit den Exportversuchen von Polymalat und der Aktivierung von Polymalatase sollte die Existenz einer Protease bei diesen Vorgängen überprüft werden.

Auf der Grundlage früherer Arbeiten (Richter, 2004) sollte wie für Mikroplasmodien auch für Makroplasmodien ein geeignetes Meßverfahren für die Messung des Exports von Polymalatase und Polymalat entwickelt werden. Mit Hilfe der neuen Meßmethode sollte eine mögliche Rolle von Polymalat bei der Aktivierung von Polymalatase durch Injektion von Polymalat überprüft werden und eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Stämmen M₃CVII und LU 887 nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, eine mögliche Beteiligung von ATP bei der Aktivierung von Polymalatase zu prüfen.

Die eindeutige immunologische Detektion von Polymalatase als auch ihrer Größe bei verschiedenen Untersuchungen gestaltete sich aufgrund des Fehlens eines qualitativ

hochwertigen Antikörpers als schwierig. Deshalb sollte in Zusammenarbeit mit einer auf die Antikörperproduktion spezialisierten Firma ein Antikörper für Polymalatase hergestellt und seine Spezifität überprüft werden. Mit Hilfe des neuen Antikörpers sollte die Größe der Polymalatase erneut im intrazellulären und extrazellulären Raum immuno-logisch bestimmt werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Arbeit stellte die Produktion eines rekombinant hergestellten Fusionsproteins mit Histidin-Resten von Polymalatase dar. Dieses Protein sollte als Ausgangspunkt für weiterführende Arbeiten dienen. Dabei sollte das Poly-malatase-Gen mit Hilfe der PCR Reaktion vervielfältigt werden und in einem *E. coli*-Expressionsystem exprimiert werden. Das Produkt sollte anschließend auf vorhandene Aktivität überprüft und eventuell eine Aktivierung versucht werden.

Durch Injektion von siRNA und dsRNA war eine Suppression der Expression der Polymalatase bei Makroplasmodien möglich. Dabei sollten die Auswirkungen der Suppression auf den Polymalatgehalt der Membranfraktion und auf den Gesamtgehalt an Polymalat untersucht werden. Mit Hilfe dieser Methodik sollte auch die Frage der Abhängigkeit von Polymalatexport und Polymalatase geprüft werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	Roth
AgNO ₃	Roth
Ammoniumperoxo-Disulfat	Merck
Ampicilin	Roth
ATP	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Yeast-Extract	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA	Boehringer
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Blue G 250	Serva
Chloroform	Merck
DEPC	Sigma
Desoxynukleotridtriphosphat	MBI Fermentas
DTT	Biomol
EDTA	Merck
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck
EGTA	Sigma

Essigsäure technisch	Merck
Ethanol technisch	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Glutardialdehyd	Sigma
D (+)-Glucose-Monohydrat	Difco
Glycerin	Baker
Glycin	Roth
Häminchlorid	Flucka
HCl	Roth
Hydraziniumhydroxid	Merck
IPTG	Bio Vectra
Isopropanol	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Kanamycin	Roth
Magermilchpulver	Naturaflor
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
L-Malat	Sigma
Mangan(II)chlorid-Heptahydrat	Merck
Methanol	Baker
NAD ⁺	Roche
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
NOWA A+B	Mo Bi Tec
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25/24/1	Roth
Ponceau S	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail	Roche
Saccharose	Merck

TEMED	Serva
Tris	Serva
Triton X 100	Serva
Trypanblau	Sigma
X-Gal	Roth
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck
Zitronensäure-Monohydrat	Merck

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen und besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad.

2.2 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Agarosegelkammer (12 x 24) und Zubehör	Lehrstuhlwerkstatt
Analysenwaage H20T	Mettler
Analysenwaage L 610 D	Sartorius
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Blockthermostat Thermomixer 5436	Eppendorf
Blotapparatur Apparatur Fastblot B34	Biometra
Brutschrank	Mytron
Chemoluminescent Detection Film	Boehringer Mannheim
Drucker für Fotoanlage video copy processor P67 E	Mitsubishi
Digital Sonifier W 250	Branson
Energiesparlampe 100W	Osram
Filter, grün, lila	Fundus des Labors
Filter, rot	Kodak

Fotoanlage MultiDoc-It Digital Imaging System UVP mit Kamera C-4000 Zoom (Olympus)	
Inkubationsschrank mit Schüttler GFL3033	New Brunswick Science
Inkubationsschrank GTRO 214	Memmert
Inkubatortruhe mit Temperaturkontrolleinheit KS 40	Heuser
Magnetrührer MR1	Heidolph
Netz (Fliegengitter)	Tesa
Folie (Einmachfolie)	Oetker
Mikroinjektionsanlage bestehend aus Feintrieb- Mikroinjektionsapparatur und Binokular M5 (Wild)	Leitz
Lampengewinde im Schirm	Helo
Mikroskop, Laborlux	Leitz
Mikrowellengerät	Siemens
Mini Gel Twin Apparatur	Biometra
Neugebauer Zählkammer	Thoma
Ölkompressorpumpe ELNOR 350 C für Speed- Vac	Alcatel
PCR Cycler PTC-100	MJ Research
Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm)	Sarstedt
pH-Meter, MultiLab 540	WTW
Pipettensatz	Gilson
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikküvetten	Sarstedt
Power supply EPS 200	Pharmacia
Power supply 800332	Camag
Potter	B. Braun
PVDF Transfer Membran Immobilon-P	Millipore
Quarz-Küvetten	Hellma

Reaktionsgefäße	Eppendorf
SDS-Gelapparatur Minigel-Twin	Biometra
SDS-Gelplatten und Zubehör	Amersham
Speed-Vac RC 10.10	Jouan
Schüttler:	
Schüttler für Kulturhaltung G-33-B	New Brunswick Scientific
Brutschrankschüttler	Intors
Spektrometer:	
UV/VIS Spectrophotometer Jasco V530	Jasco
Fluoreszenz-Spectrophotometer F-3000	Hitachi
Photometer Ultrospec III	Pharmacia
Zentrifugen und Rotoren:	
Biofuge 17 RS	Heraeus Sepatech
Superspeed Centrifuge RC 2-B	Sorvall
Superspeed Centrifuge RC 5-B	Sorvall
Ultrazentrifuge Centrikon T2060	Kontron Ultracentrifuge
Rotor für UZ; SW 28 Ti	Beckman
Tischzentrifuge Biofuge B	Heraeus Sepatech
Tischzentrifuge Centrifuge 5414	Eppendorf

2.3 Enzyme und Antikörper

Antikörper:	
Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen Ig G	Pierce
Antikörper p97	Diplomarbeit Karl (1996)
Antikörper p97 Neu	Pineda
Anti-His ₆ -Peroxidase	Roche

Enzyme:

DNase I	Qiagen
L-Malat-Dehydrogenase (5 mg/ml) aus Schweineherzmitochondrien	Roche
Pfu-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzym Sma I	MBI Fermentas
Restriktionsenzym Sac I	MBI Fermentas
Restriktionsenzym Sal I	MBI Fermentas
Restriktionsenzym EcoR I	MBI Fermentas
Restriktionsenzym Nhe I	MBI Fermentas
Restriktionsenzym Not I	MBI Fermentas
Revert Aid H-Minus M-MuLV RT	MBI Fermentas
RNAse-Inhibitor	MBI Fermentas
SAP	Boehringer
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas

2.4 Kit-Systeme

NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
QiAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QiAquick PCR Purifikation Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

2.5 Medien

2.5.1 Nährmedien für *Physarum polycephalum*

Die Anzucht von *Physarum polycephalum* (Stamm M₃CVII) erfolgte in einem halbsynthetischen Nährmedium (modifiziert nach Daniel & Baldwin, 1964). Dieses enthielt folgende Komponenten:

Bestandteile	Konzentrationen (g/l)
Bacto- Hefeextrakt	1,5
Bacto-Trypton	10,0
Calciumchlorid-Dihydrat	0,6
D-Glucose-Monohydrat	11,0
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	0,084
Häminchlorid	0,005
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,6
Mangansulfat-Heptahydrat	0,084
Zinksulfat-Heptahydrat	0,034
Zitronensäure-Monohydrat	3,54

Die Komponenten $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, und $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ wurden als 100fach konzentrierte Stammlösung (MMZ-Lösung) angesetzt. Diese MMZ-Lösung wurde in der Konzentration 10 ml/l zum Nährmedium hinzugefügt.

Da Hämin erst kurz vor dem Animpfen zugegeben wurde, erfolgte die Herstellung einer Stammlösung von 0,5 g/l in 0,25 M Natronlauge. Diese Stammlösung wurde separat autoklaviert.

Die restlichen Bestandteile des Mediums mit Ausnahme des Hämins wurden in Wasser gelöst und mit 5 N NaOH auf $\text{pH } 4.6 \pm 0.05$ titriert. Das Medium wurde zu 100 ml in 500 ml einfach gekerbte Erlenmeyerkolben gefüllt und autoklaviert (120 °C, 2 bar, 20 min).

Physarum-Agarplatten

Für die Herstellung von Physarum-Agarplatten wurde mit H₂O bidest. eine 4%ige Agarlösung hergestellt und nach dem Autoklavieren 1:1 mit sterilem Physarum-Medium gemischt. Nachdem diese Lösung auf 55 °C abgekühlt war, wurden 10 ml Hämin pro Liter Medium zugegeben und die Lösung in Petrischalen gegossen.

2.5.2 Medien für E. coli

Luria Bertani Medium (LB-Medium) (Sambrook et al. 2001)

Bacto Trypton	1 %
Bacto Hefe Extrakt	0,5 %
NaCl	1%

Der pH wurde mit 5 M NaOH auf 7,6 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert. Sollte für die Selektion plasmidtragender Klone dem Medium noch ein Antibiotikum zugefügt werden, so wurde nach dem Autoklavieren gewartet, bis das Medium auf 50 °C abgekühlt war und das entsprechende Antibiotika in der jeweiligen Konzentration zugegeben.

LB Agarplatten

Für Agarplatten wurden zu 1000 ml LB-Medium 10 g Agar gegeben und autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung sofort bodenbedeckend in Petrischalen gegossen. Für LB_{amp/kan} wurde gewartet, bis die Lösung auf 50 °C abgekühlt war und das entsprechende Antibiotika in der jeweiligen Konzentration zugegeben. Für Blau-Weiß-Selektion wurde neben dem Antibiotika 0,5 mM IPTG noch 80 µg/ml X-Gal zugegeben und die Lösung in Petrischalen gegossen.

2XL-Medium für *E. coli* Transformation

Bacto Trypton	20 g
Yeast Extrakt	10 g
NaCl	1 g

Die Bestandteile des Mediums wurden in 900 ml H₂O bidest. gelöst und mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l mit H₂O bidest. aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 10 ml 20 % Glucoselösung steril zugegeben und bei 4 °C gelagert.

CMN-Puffer

100 mM NaAc pH 7	40 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,47g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,385 g

Der Ansatz wurde mit 1 M CH₃COOH auf pH 5,5 eingestellt, auf 100 ml H₂O bidest. aufgefüllt und anschließend steril filtriert.

SOC-Medium

Bacto Trypton	20 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g

Die Komponenten wurden in 950 ml H₂O bidest. gelöst, 10 ml 250 mM KCl zugegeben und mit 5 N NaOH den pH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde ad 1 l mit H₂O bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 5 ml 2 M MgCl und 20 ml 1 M Glucoselösung steril zugeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Allgemeine Puffer

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,5 mM
Na_2HPO_4	8,1 mM
NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
	pH 7,4

Tris-Puffer

Tris-Cl	1 M
---------	-----

Der gewünschte pH wurde mit rauchender HCl eingestellt.

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)

Tris-Cl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM

2.6.2 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

Tris-Cl	40 mM
Essigsäure	0,1 %
EDTA	1 mM

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 8,3 eingestellt.

Ethidiumbromid

Ethidiumbromid	1 % (w/v)
----------------	-----------

6 x Gelauftragspuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
----------------	--------------

Xylencyanol	0,25 % (w/v)
-------------	--------------

Glycerol	30 % (v/v)
----------	------------

Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.3 Lösungen für Arbeiten mit RNANatriumacetat

Natriumacetat	1 M
---------------	-----

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 4,9 eingestellt.

DEPC-Wasser

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurden auf 1000ml H₂O bidest. 1ml DEPC gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde zweimal autoklaviert.

2.6.4 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen**2.6.4.1 Lösungen für SDS-PAGE**

Tris-Cl	25 mM
---------	-------

Glycin	192 mM
--------	--------

SDS	0,1 % (w/v)
-----	-------------

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 8,8 eingestellt.

2.6.4.2 2 x SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970)

Tris-Puffer pH 6,8	90 mM
Glycerin	19 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	0,7 M
Bromphenolblau	0,015 mM

Der Puffer wurde stets im Verhältnis 1:1 mit der jeweiligen Probe vermischt.

2.6.4.3 Lösungen für das Western-BlottingWestern Blot-Puffer (WB-Puffer)

Methanol	20 % (v/v)
Tris	50 mM
Glycin	40 mM

PBS-Tween

Es wurden 2 ml Tween-20 zu 1000 ml PBS zugegeben. Die Endkonzentration betrug 0,2 %.

Ponceau S-Färbelösung

Ponceau S	2 % (w/V)
Trichloressigsäure	30 % (v/v)

2.6.5 Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion

IPTG

Für eine 0,1 M Stammlösung wurden 240 mg IPTG in 10 ml H₂O bidest. gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt.

X-Gal

Für eine Stammlösung der Konzentration 50 mg/ml wurden 100 mg X-Gal in 2 ml DMF gelöst. Die Stammlösung wurde im Dunkeln bei –20 °C aufbewahrt.

2.6.6 Stammlösungen der Antibiotika

Ampicilin

In 10 ml H₂O bidest. wurden 500 mg Ampicilin gelöst. Die 50 mg/ml Stammlösung wurde steril filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Kanamycin

Es wurde eine 75 mg/ml Stammlösung in H₂O bidest. hergestellt und anschließend steril filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Chloramphenicol

Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 34 mg/ml in Ethanol gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.6.7 Lösungen für den Zellaufschluß

Extraktionspuffer für den Aufschluß von Mikroplasmodien

Tris / HCl pH 7,5	50 mM
EGTA	50 mM
2-Mercapthoethanol	14 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	300 mM
Proteaseinhibitorcocktail	0,5 %
Glycerin	20 %

Proteaseinhibitorcocktail

Leupeptin	100 µM
Pepstatin	10 µM
PMSF	1 mM
Benzamidin	1 mM
Pefabloc	100 µM
TLCK	100 µM
E 64	2 µg/ml
Aprotinin	1 mg/ml
	pH 7,5

Eine Tablette Proteaseinhibitorcocktail wurde gemäß Herstellerangaben in 2 ml H₂O bidest. gelöst. Dies entsprach einer 25fach konzentrierten Lösung.

2.6.8 Lösungen für den Export von Polymalat und Polymalatase

Exportpuffer

Citrat	17 mM
MgCl ₂	13 mM
Saccharose	215 mM

Der pH wurde mit rauchender Salzsäure auf pH 4 eingestellt.

Glycin Hydrazin-Puffer

Glycin 760 mM

Hydrazinhydrat 2 % (v/v)

Der pH Wert wurde mit 5 N NaOH auf 9,0 eingestellt.

Weitere Puffer und Lösungen finden sich in den Beschreibungen der Methoden, bei denen sie zum Einsatz kamen.

2.7 Organismen

2.7.1 *Physarum polycephalum*

Plasmodien Stamm M3CVII

Plasmodien (Albino-Mutante, haploid) Stamm LU 887

2.7.2 Bakterienstämme

E. coli JM 109 (Yanisch-Perron et al., 1985)

[F⁺, tra 36, proA⁺B⁺, lacI^q, Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB), glnV44, e14⁻, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi, hsdR17]

E. coli DH10 B

[Δ (mrr-hsd RMs-mcrBC) mcrA recA1]

E. coli DH 5α (Hanahan, 1983)

[F⁻, endA1, hsdR17 (r_k⁻m_k⁻), supE44, thi1, gyrA (Nal^r), relA1, Δ(lacZYA-argF) U169, Φ80lacZΔM15]

E. coli BL21(DE3) (Studier & Moffat, 1986)

hsdS, gal[λ cl, ts 857, cnd1, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1]

In *E. coli* BL21(DE3) codon+ werden tRNA-Gene von einem zusätzlichen Plasmid coexprimiert, welche Anticodone zu in *E. coli* seltenen Codonen enthalten (Arginin: AGG und AGA; Isoleucin: AUA; Leucin: CUA). Das Plasmid enthält die Antibiotika-resistenz für Chloramphenicol.

2.8 Vektoren

2.8.1 pET-Vektoren zur Genexpression in Escherichia coli

Gene in pET-Vektoren (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) werden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert (Studier et al. 1990). So können sie nur in *E. coli* Stämmen ex-primiert werden, die eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens besitzen, z. B. *E. coli* BL21(DE3).

Die Expression der T7-RNA-Polymerase erfolgt unter Kontrolle eines lacUV5-Promoter-Operators und wird durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Expression des in den pET-Vektoren ebenso über einen Lac-Operator reguliert. Das dazu erforderliche lac-Repressor-Gen (lacI) ist plasmidkodiert und wird konstitutiv exprimiert. Als Replikationsursprung (ori) besitzen die pET-Vektoren einen origin of replication von pBR322.

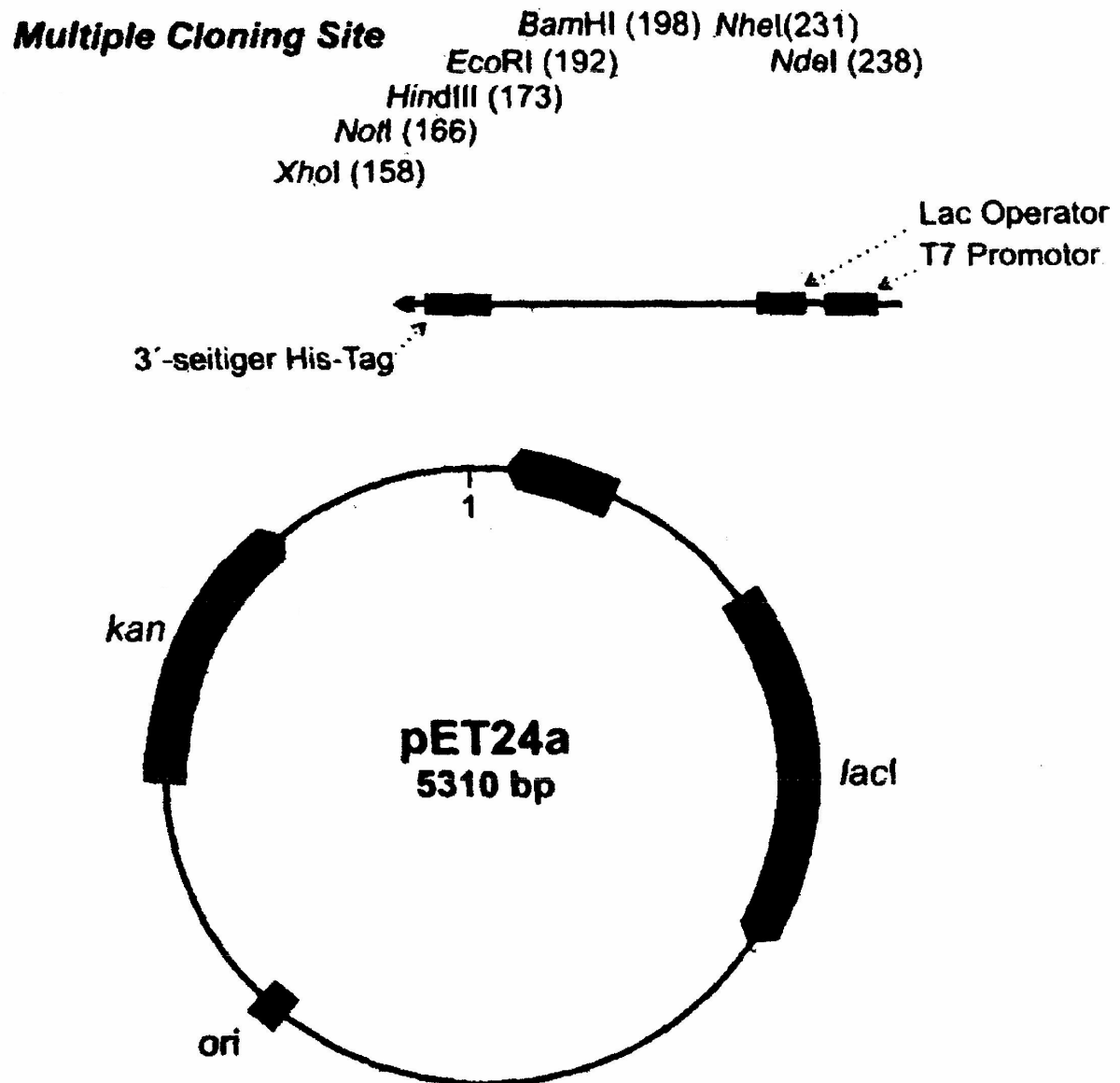


Abbildung 6: Schematische Darstellung des pET 24 a (+)-Vektors

Der Vektor pET 24 a (+) (Abbildung 6) enthält als Selektionsmarker für die Plasmidaufnahme das Kanamycinnucleotidyltransferase-Gen (kan). Das in die Multiple Cloning Site klonierte Gen kann 3'-seitig mit der Sequenz für einen Hexahistidin-Tag versehen werden, das wegen des Fehlens einer Proteaseschnittstelle posttranslational nicht entfernt werden kann.

2.8.2 pUC 19

In Abbildung 7 ist eine schematische Darstellung von pUC 19 gezeigt.

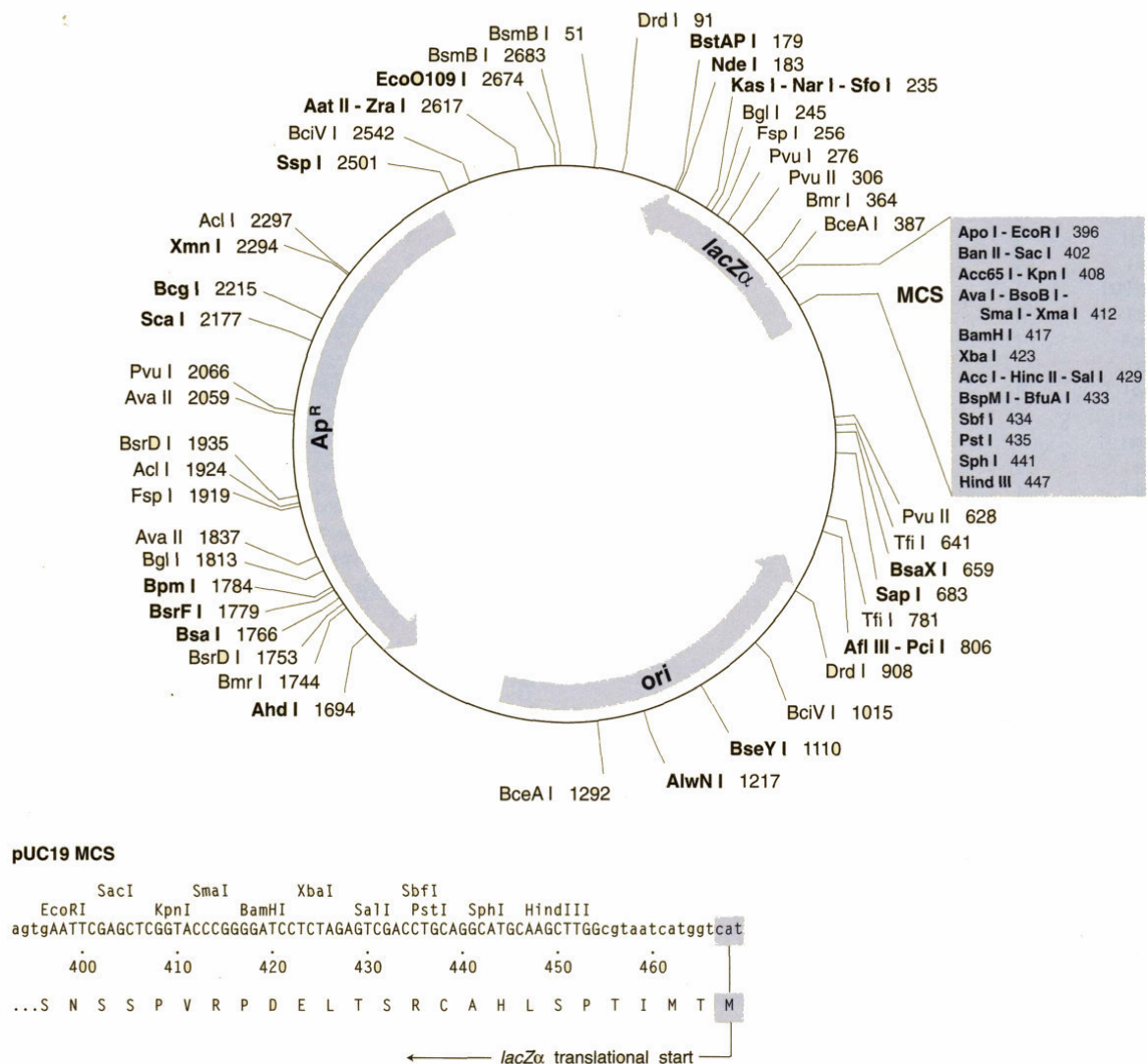


Abbildung 7: Schematische Darstellung des pUC 19-Vektors

pUC-Vektoren sind Klonierungsplasmide mit Bestandteilen der pBR322- und M13mp19-Vektoren (Yanisch-Perron et al., 1985). Als Replikationsursprung (ori) besitzt der pUC 19-Vektor (Abbildung 7) einen abgewandelten pMB1 origin of replication von pBR322, so daß bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C etwa 75 und bei 42 °C mehr als 200 Vektoren pro Zelle vorkommen (Lin-Chao et al., 1992).

Die Selektion auf Plasmidaufnahme erfolgt über Ampicillin-Resistenz, die durch Expression des β -Lactamase-Gens ausgeprägt wird. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors liegt stromaufwärts vom Genfragment der β -Galaktosidase (*lacZ*), so daß eine Blau-Weiß-Selektion der Kolonien (Kapitel 3.2.3) möglich ist.

2.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Angabe der Sequenz erfolgt in 5'–3'-Orientierung.

PMLA F3	TGTTCTGGGCACGAGTCTTAGTGG
PMLA F9	TTGGCACAAGCACGTTGTTCAAGC
PMLA SP FY1	CACAGTAGGAGTGCTTGTAT
PMLA RV YE1	GTGCGGCCGCTCATAGTTTGCTCATTTCTTG
PMLA RV11	TGTTTATTGCCGTTTGTTACATAAAGAGG
PMLA RV3	CTCACCCCTCCAAAATGCAATCAC
PMLA RV6	AACGTGCTGGGTGTGAATTACGAC
PMLA-NheI	CATCTAGCTAGCCACAGTAGGAGTGCTTGTAT
PMLA-NotI	GTATAGGCGGGCCGCGCCGGTTTGTTACATAAAGAGG
Oligo(dT)18	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
dsRNA For	GTGTAATACGACTCACTATAGGGAAAAGGAGGTTCTGATCCTA GT
dsRNA Rev	CACTAATACGACTCACTATAGGGATCACGATGTCATCAGCAA
siRNA sense	TCGAGTAAGTACTAGAGCTCCTATAGTGAGTCGTATTAGT
siRNA antisense	AAGGAGCTCTAGTACTTACTCTATAGTGAGTCGTATTAGT

Alle Oligonukleotide lagen in dephosphoryliertem Zustand vor. Die Primer PMLA FY1 und PMLA RV YE1 gab es sowohl in den Varianten dephosphoryliert als auch phoshoryliert.

2.10 DNA- und Protein-Standards

2.10.1 DNA-Standard

Der Generuler DNA Ladder Mix diente zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarose-Gelen nach Färbung mit Ethidiumbromid. Mit dem Massruler DNA-Ladder-Mix war zusätzlich noch eine Konzentrationsabschätzung der Fragmente im Agarose-Gel möglich, da die verschiedenen Größenbanden in bestimmten Konzentrationen vorlagen.

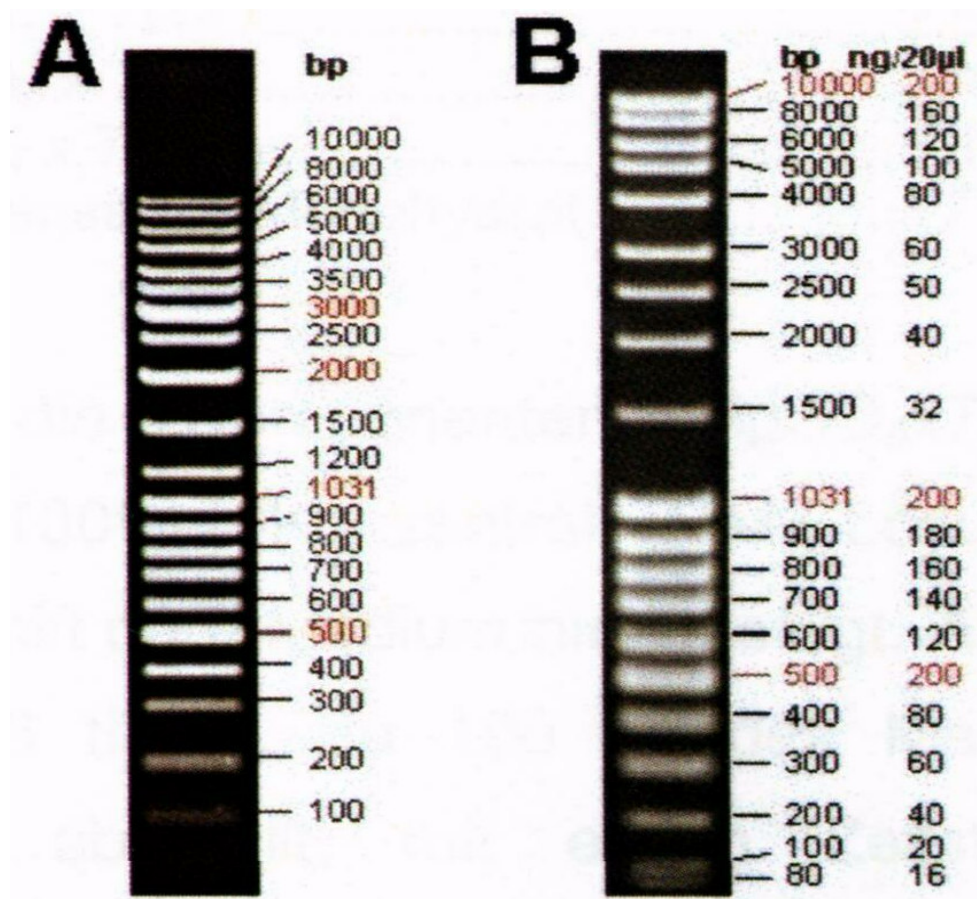


Abbildung 8: DNA-Standards zur Abmessung der Größe von DNA-Fragmenten

- A) Generuler DNA-Ladder-Mix (Fermentas):** Die Zahlen geben die Größe der jeweiligen Bande in Basenpaaren an. Die Banden mit besonders großer Intensität sind durch rote Zahlen gekennzeichnet.
- B) Massruler DNA-Ladder-Mix (Fermentas):** Die Zahlen der zweiten Reihe geben die Konzentration der jeweiligen Bande in ng/20µl an.

2.10.2 Protein-Standard

Als Proteinmarker zur Abschätzung der Größe von Proteinen in SDS-Gelen wurde der SDS 200 von Sigma benutzt. Er setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Myosin	205 kDa
β-Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase B	97 kDa
BSA	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	29 kDa

3 Methoden

3.1 Anzucht

3.1.1 Anzucht von *Physarum polycephalum*

3.1.1.1 Anzucht von Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mikroplasmodien von *Physarum polycephalum* Stamm M₃CVII zu Exportversuchen verwendet. Die Kultivierung erfolgte im halbsynthetischem Medium nach Daniel & Baldwin (Kapitel 2.5.1) im Dunkeln bei 24°C, pH 4,6 und 180 Upm (New Brunswick Schüttler). Dazu wurden im 500 ml einfach eingekerbten Erlenmeyerkolben 1 ml Hämin zu 100 ml Medium gegeben. Zur Durchführung aller Versuche zum Export von PMLA und Polymalatase wurden standardisiert zwei Tage alte Kulturen verwendet, die durch Überimpfung aus 2 ml dichter Mikroplasmodienlösung entstanden waren. Modifikationen bei der Anzucht wurden an entsprechender Stelle angegeben.

3.1.1.2 Anzucht von Mikroplasmodien des Stammes LU 887

Die Kultivierung von Mikroplasmodien des Stammes LU 887 (weiß, haploid) erfolgte prinzipiell wie die des Stammes M₃CVII. Anstelle der einfach gekerbten Erlenmeyerkolben wurden nur ungekerbte Erlenmeyerkolben verwendet. Aufgrund des etwas langsameren Wachstums des Stammes LU 887 wurden standardisiert 3 Tage alte Mikroplasmodien für sämtliche Versuche verwendet.

Abweichungen von diesen Anzuchtbedingungen wurden an entsprechender Stelle vermerkt.

3.1.1.3 Anzucht von Makroplasmodien

Die Anzucht der Makroplasmodien erfolgte auf Rundfiltern, die auf Metallgitter in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) gelegt wurden. Aus einer im Kapitel 3.1.1.1 bzw. 3.1.1.2 beschriebenen 24 h alten Schüttelkultur des Stammes M₃CVII bzw. LU 887 ließ man die Mikroplasmodien absetzen. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde im gleichem Volumen Medium gewaschen. Nach nochmaligen Absetzen der Zellen und erneuter Entfernung des Überstandes wurden 300 µl des Pellets mit einer Weithalspipette in die Mitte eines Rundfilters (Durchmesser 10 cm) überführt. Der Rundfilter lag auf einem Metallgitter. Daraufhin wurde gerade soviel (20 ml) Medium (Kapitel 2.5.1) in die Petrischale gegeben, daß sich der Rundfilter mit Medium voll saugen konnte. Die Inkubation erfolgte weitere 24 h bei 27 °C im Brutschrank.

Abweichungen von diesen Anzuchtbedingungen sind an der entsprechenden Stelle vermerkt.

3.1.2 Anzucht von *E. coli*-Stämmen DH10B, DH5α und JM109

Die Anzucht aller *E. coli*-Stämme erfolgte sowohl als Flüssigkultur als auch auf Agarplatten grundsätzlich bei 37 °C und in LB-Medium (Kapitel 2.5.2). Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde mit Hilfe einer gebogenen Pasteur-Pipette auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h im Brutschrank inkubiert. Für das Animpfen in Flüssigmedium wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher abgehoben und in das entsprechende Volumen LB-Medium überführt. Für die Selektion auf plasmidtragende Klone enthielt das Flüssigmedium zusätzlich noch das jeweilige Antibiotikum in entsprechender Konzentration (Kapitel 2.6.6). Falls eine Blau-Weiß-Selektion (Kapitel 2.6.5) möglich war, wurde neben dem Antibiotikum noch IPTG und X-Gal zugegeben.

3.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Einzelkolonie eines gewünschten *E. coli*-Stammes wird in 2 ml 2XL-Medium (Kapitel 2.5.2) angeimpft und 12 h bei 37 °C und 225 Upm. inkubiert (Übernachtskultur). Am nächsten Morgen werden 100 ml 2XL-Medium auf 37 °C vorgewärmt und mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft. Im Schüttelinkubator wird bis zu einer O.D._{660nm} von 0,2 inkubiert. Danach werden 2 ml 1 M MgCl₂ dazupipettiert und bis zu einer O.D._{660nm} von 0,5 bei 37 °C weitergeschüttelt. Die Kultur wird 2 h auf Eis gestellt und dann zentrifugiert (Sorvall; GSA-Rotor; 4 °C; 5 min; 5000 rpm).

Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 20 ml eiskaltem CMN-Puffer suspendiert. Nach 60 min Inkubation bei 0 °C wird im vorgekühlten Rotor zentrifugiert (SS34-Rotor; 4 °C; 5 min; 4000 rpm). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 2 ml eiskaltem CMN-Puffer mit einer eisgekühlten Pipette sorgfältig suspendiert. Die Suspension stellen die kompetenten Zellen dar. Sollten diese Zellen nicht sofort zur Transformation verwendet werden, wurden 60 % Glycerin (Endkonzentration 15 %) zugegeben und die Zellen bei - 80 °C aufbewahrt.

3.2.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

15 ml Falconröhrchen werden im Eis vorgekühlt und der jeweilige Transformationsansatz wird auf den Boden pipettiert. Je Ansatz werden 100 µl kompetente Zellen (Kapitel 3.2.1) zugegeben und nach vorsichtiger Mischung 30 min bei 0 °C im Eis inkubiert. Der Ansatz wird exakt 45 sek im Wasserbad auf 42 °C erhitzt und für 2 min im Eis inkubiert. Dann werden 0,9 ml vorgewärmtes 42 °C SOG-Medium zugegeben und die Röhrchen für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 225 Upm inkubiert. Die Ansätze werden dann 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Vom Überstand werden 700 µl abgenommen und die Zellen im Restvolumen resuspendiert. Die Ansätze werden im Anschluß auf die jeweiligen Agarplatten mit den passenden Antibiotika ausplattiert.

Wenn eine Blau-Weiß-Selektion erwünscht war, mussten die Platten neben dem Antibiotikum noch IPTG und X-Gal enthalten.

3.2.3 Blau-Weiß-Selektion

Für die Blau-Weiß-Selektion geeignete Bakterien tragen in ihrem Genom eine Deletion, durch die sie den N-terminalen Teil ihrer β -Galaktosidase nicht exprimieren können. Solche Bakterien können wieder ein funktionsfähiges Enzym produzieren, wenn sie ein Plasmid aufgenommen haben, das für diesen N-terminalen Teil kodiert. Dann ist es für die Bakterien möglich, X-Gal enzymatisch umzusetzen und daraus den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol abzuspalten, durch den die Kolonien blau gefärbt werden. Der Einbau eines DNA-Fragments in die Polylinkerregion zerstört das lac-Z Gen und somit kann keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr gebildet werden. Dadurch bleiben die betreffenden Bakterienkolonien in Gegenwart von X-Gal weiß, wobei IPTG als Induktor für die β -Galaktosidase dient. Sind also Zellkolonien durch X-Gal blau gefärbt, ist die β -Galaktosidase noch funktionsfähig, d.h. es wurde bei der Ligation keine Fremd-DNA in den Vektor eingebaut. Sind die Zellkolonien weiß, so ist die β -Galaktosidase nicht funktionsfähig, d. h. es wurde Fremd-DNA in den Vektor eingebaut und das β -Galaktosidase-Gen zerstört.

3.3 Ernte und Zellaufschlüsse

3.3.1 Ernte von Mikroplasmodien

Die 2 Tage alten Zellen wurden durch Absieben über ein feinmaschiges Netz vom Medium getrennt. Dann wurde zweimal mit je 25 ml Medium (Kapitel 2.5.1) gewaschen. Um die Zellen nicht unnötigem Stress auszusetzen, wurde auf die sonst übliche Trocknung mit Cellulosetüchern verzichtet. Zur Einwaage wurden die Zellen mit einem Spatel vom Netz direkt in einen vorher gewogenen Potter überführt.

3.3.2 Zellaufschlüsse

3.3.2.1 Rohextraktpräparation bei Makroplasmodien

Nach der Ernte der Makroplasmodien werden diese gewogen und in einen Potter überführt. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Dazu werden 2 Volumen Gesamtaufschluß-Puffer (Kapitel 2.6.7), 1/25 Volumen Protease-inhibitorcocktail (aus dem Volumen des Lyse-Puffer berechnet) und 1/1000 Volumen β -Mercaptoethanol (berechnet aus dem Gesamtvolumen) zugegeben. Nach Homogenisierung der Zellen durch 8 - 10maliges auf und abbewegen des Stössels wurde die Probe in ein sauberes Eppendorf-Cup überführt und bei 17000 rpm 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, ohne das Pellet zu zerstören. Dieser Überstand wurde wieder für 15 min bei gleicher Umdrehung zentrifugiert. Das Lysat wurde entweder für die sofortige Analyse verwendet oder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.2.2 Fraktionierter Zellaufschluß

Zu Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Mikroplasmodien, wie in Kapitel 3.1 und 3.3 beschrieben, geerntet und gewaschen. Die Zellen wurden auf 1 g im Potter eingewogen.

Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit 3 ml eiskalten Extraktionspuffer mit Proteaseinhibitorcocktail (Kapitel 2.6.7) versetzt und 8 - 10mal im Potter durch auf- und abbewegen des Stössels aufgeschlossen. Nach dem Aufschluß wurde bei 4 °C 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet erneut mit 1,5 ml Aufschlußpuffer im Potter auf gleiche Weise aufgeschlossen und ebenfalls bei 4 °C 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet (P1) wurde auf Eis gestellt und die beiden Überstände (Ü1) vereinigt. Dieser Überstand wurde nun bei 4 °C für 20 min bei 10000 g zentrifugiert (Ü2 und P2).

Die erhaltenen Überstände und die beiden Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Ü1= Cytoplasma + Membransuspension (ER, Golgi und Cytoplasmamembran)
Ü2= Cytoplasma
P1= Zellkerne und restliche ganze Zellen
P2= Cytoplasmamembran und andere Membrane

Tabelle 3: Bestandteile der Fraktionen

3.3.2.3 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zur Membranisolierung

3.3.2.3.1 Herstellung eines Dichtegradienten

Die Zentrifugation erfolgte in einem linearen Saccharose-Dichtegradienten. Dieser wurde als Stufengradient in Zentrifugenröhrchen für den SW 28-Rotor vorgelegt. Es wurden zunächst sechs unterschiedliche konzentrierte Saccharose-Lösungen in einem Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM KCl und 4 % (v/v) Proteaseinhibitorcocktail (Kapitel 2.5)) hergestellt. Bei den verschiedenen Saccharose-Lösungen handelte es sich um folgende Konzentrationen: 30 %, 37 %, 44 %, 51 %, 58 % und 65 % (w/w).

Von der höchst konzentrierten Lösung 65 % wurden 5 ml in das Zentrifugenröhrchen mit einer Glaspipette gefüllt und sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Beginnend mit der nächst niedrigeren Konzentration wurden nun jeweils 2 ml jeder Konzentrationsstufe in das Zentrifugenröhrchen gefüllt und ebenfalls sofort mit flüssigem Stickstoff gefroren, um ein Durchmischen der verschiedenen Phasen zu verhindern. Die fertigen Zentrifugenröhrchen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und waren so mehrere Wochen haltbar.

3.3.2.3.2 Membranisolierung und Ultrazentrifugation

Der Saccharose-Gradient wurde zwei Stunden vor der Ultrazentrifugation bei 4 °C aufgetaut.

100 ml Plasmodienkultur wurden geerntet und 2mal mit 0,14 M NaCl gewaschen und in den 50 ml-Potter überführt. 2 g Zellen wurden mit 30 ml Homogenisierungspuffer durch 10maliges auf- und abziehen suspendiert. Anschließend wurde bei 4 °C 5 min bei 1000 g im SS 34 Sorvall zentrifugiert. Im Mikroskop wurde überprüft, ob sich im Überstand noch Kerne befanden. War dies der Fall, wurde der Zentrifugationsschritt nochmals wiederholt. Der kernfreie Überstand wurde 20 min bei 20000 g mit dem SS 34 Rotor in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 2 ml 10 % Saccharose-Lösung pro ursprüngliche Plasmodienlösung (100 ml) gelöst und im Potter homogenisiert. 17,5 ml des Homogenisats wurden auf die aufgetaute Lösung mit dem Gradienten aufgetragen. Dann wurde bei 4 °C im vorgekühlten SW 28 Rotor bei 20000 rpm für 90 min zentrifugiert. Danach wurden Fraktionen von je 2 ml vom Boden des Zentrifugenröhrchens her mit Hilfe einer Pasteur-Pipette entnommen. Die Fraktionen wurden mit dem alkalischen Phosphatase-Assay auf Cytoplasmamembran getestet und anschließend mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –20 °C gelagert.

3.3.2.3.3 Detektion der membranhaltigen Fraktion

Bestandteile des Phosphatase-Assay	Volumen (µl)
Tris-Puffer pH 10,7	200
0,5 M MgCl ₂	5
Triton X 20%	250
pNP	200
H ₂ O bidest.	315
Fraktion	30

Tabelle 4: Phosphatase-Assay

Zum Nachweis der Cytoplasma-Membranfraktion dient ein Assay für alkalischen Phosphatase. Der Testansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 420 nm im Photometer gemessen. Dabei bildet sich p-Nitrophenol, ein gelber Farbstoff.

3.4 Arbeiten mit RNA

3.4.1 Reinigung von Gesamt-RNA aus Mikroplasmodien

Alle Eppendorfreaktionsgefäße und Spitzen waren silikonisiert und autoklaviert. Alle übrigen Materialien waren mit DEPC-H₂O behandelt oder 4 h bei 200 °C sterilisiert. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Mikroplasmodien in eine mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Mörserschale gegeben und in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Pistills zermörsert. Daraufhin wurden vier 1,5 ml vorher gewogenen silikonisierte Eppendorfreaktionsgefäße bis etwa zur Hälfte gefüllt und diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das auf diese Weise lyophilisierte Zellmaterial wurde in 450 µl RLC-Puffer mit β-Mercaptoethanol (0,01 % v/v) des RNeasy-Kits von Qiagen (Kapitel 2.4) aufgenommen und entsprechend des Protokolls „Plant and Fungi“ Seite 75 weiterbehandelt. Die Elution von den Säulen erfolgte zweimal mit je 50 µl RNase freiem Wasser (Kapitel 2.6.3). Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten Gesamt-RNA erfolgte photometrisch (Kapitel 3.4.2).

3.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte analog zur Konzentrationsbestimmung von DNA (Kapitel 3.5.3). Als Referenz wurde DEPC-H₂O verwendet. Eine OD₂₆₀ entsprach einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Die Bestimmung der Reinheit der RNA erfolgte in gleicher Weise wie die der DNA (Kapitel 3.5.2)

3.4.3 Reverse Transkription

Für eine PCR ist DNA als Ausgangsmaterial notwendig. Aus diesem Grund muß die eluierte RNA (Kapitel 3.4.1) in DNA umgeschrieben werden (Sambrook et al., 2001). Dazu bedient man sich der revert Aid H-Minus M-MuLV Reversen Transcriptase (MBI Fermentas). Dieses Enzym benutzt eine RNA-Matrize, um ausgehend von einem Primer den komplementären DNA-Strang (cDNA) zu synthetisieren (Gerard et al. 1993). Für die vollständige und spezifische Transkription vom 3'-Ende wurde ein Oligo (dT)-Primer verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Reverse Transkriptase besaß eine Punktmutation in ihrer RNase H-Domäne. Diese Modifikation erhöht die Wahrscheinlichkeit, vollständige cDNAs auch im Bereich der 5'-Enden zu erhalten, da der Abbau der RNA-Matrizen verlangsamt wird. Im Folgenden wird der typische Reaktionsverlauf beschrieben.

Nach der Extraktion der Gesamt-RNA aus Mikroplasmodien von *Physarum polycephalum* (Kapitel 3.4.1) und anschließender Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (Kapitel 3.4.2) wurden in einem 0,6 ml Eppendorfreaktionsgefäß folgende Komponenten pipettiert:

RNA	1 µg
Oligo (dT) ₁₈ Primer (100µM)	1 µl
dNTP Mix (10mM)	1 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Dieser Ansatz wurde zum Anlagern des Oligo(dT)₁₈ -Primers 5 min bei 70 °C inkubiert und im Anschluß auf Eis gelagert.

M-MuLV-R-Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,25 µl
MnCl ₂ (100mM)	0,4 µl
MgCl ₂ (100mM)	0,6 µl

BSA (10mg/ml)	0,4µl
Cap direct I Primer	1µl

Nach der Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37 °C für 5 min wurde ein 1 µl Revert Aid H-Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben. Die Reverse Transkription fand für 60 min bei 42 °C statt. Anschließend wurde das Enzym bei 70 °C 10 min deaktiviert. Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5 Arbeiten mit DNA

3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Miniprep)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen (Birnboim et al., 1979). Dazu werden die *E. coli*-Zellen durch die Zugabe von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen. Während Proteine und genomische DNA durch Neutralisation gefällt werden, bleibt die Plasmid-DNA in Lösung.

Eine Übernachtskultur einer *E. coli*-Einzelkolonie (DH 5 α , BL 21 DE3, DH 10 B), die in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen wurde, wurde für 5 min bei 5000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand entfernt und das Plasmid Mini Kit (Kapitel 2.4) nach Angaben des Herstellers verwendet (Macherey-Nagel, 2003). Die Elution von den Säulchen erfolgte mit auf 50°C vorgewärmtem Elutionspuffer. Um zu prüfen, ob das gereinigte Plasmid auch das entsprechende Insert aufgenommen hatte, wurde ein analytischer Verdau mit Restriktionsenzymen (Kapitel 3.5.5) durchgeführt und anschließend die geschnittene DNA mittels Agarosegelelektrophorese untersucht.

3.5.2 Reinigung von DNA

3.5.2.1 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Für die Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen wurde der QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet (Qiagen, 2002). Die Elution erfolgte mit auf 50 °C vorgewärmtem Elutionspuffer oder mit sterilem H₂O bidest. im Falle von Sequenzierungen, da dies das Sequenzergebnis verbesserte.

3.5.2.2 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Sollten die DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel gereinigt werden, wurde die entsprechende Bande auf einem UV-Flächenstrahler NV72 KL (Benda Konrad) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, 2002). Die Elution erfolgte mit 30 µl auf 50 °C vorgewärmten Elutionspuffer.

3.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich die DNA-Konzentration bestimmen. Als Referenz diente H₂O bidest. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml. Es wurde eine 100fache Verdünnung der DNA-Lösung in einem Endvolumen von 1 ml hergestellt.

Das Verhältnis der OD₂₆₀/OD₂₈₀ stellt ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung dar. Bei Proben ohne Protein ist der Quotient größer als 1,8. Für die Bestimmung der Reinheit wurde die Lösung bei beiden Wellenlängen gegen die Referenz Wasser vermessen und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ mit folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g} / \text{ml}) = A_{260} \times 50 \times V$$

Formel 1: c: Konzentration der dsDNA / A₂₆₀: Extinktion bei der Wellenlänge 260 nm /

V: Verdünnungsfaktor

Eine weitere Möglichkeit zur Konzentrationsabschätzung von DNA war der Vergleich der Bandenintensität der DNA-Spur mit den Banden des Massruler DNA-Ladder-Mix (Kapitel 2.10.1) nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel.

3.5.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA wurde in Gelen mit 1 % (w/v) Agarose in 1 fach TAE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in einem handelsüblichen Mikrowellengerät aufgekocht und nach dem Abkühlen auf Handwärme mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach dem Erkalten der Agarose wurden die Proben mit 1/6 Volumen eines 6 x Gel - loading Puffers versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard dienten 5 µl des Genruler DNA-Ladder-Mix oder des Massruler DNA-Ladder-Mix (Kapitel 2.10.1). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 1 mA/cm² Gel durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht und fotografiert oder bei Bedarf mit dem Skalpell aus dem Gel geschnitten und gereinigt (Kapitel 3.5.2.1).

3.5.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen. Diese spalten DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Die abgeschnittenen Enden können dabei je nach Enzym glatt (blunt ends) sein oder einen Überhang tragen (sticky ends). Die Effizienz einer Restriktionsspaltung ist dabei abhängig von den Reaktionsbedingungen wie Puffer und Temperatur. Daher fand die Spaltung von DNA stets unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Temperatur und Puffer)

statt. Für analytische Verdaus wurden 2 µl Plasmid DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym im Gesamtvolumen von 20 µl bei der angegebenen Temperatur für 2 h inkubiert und anschließend 15 min bei 65 °C inkubiert, um das Restriktionsenzym zu deaktivieren. Für mehr DNA-Material wurde ein präparativer Verdaus durchgeführt. Dabei wurden 2 µg DNA mit den empfohlenen Units Enzym bei einem Reaktionsvolumen von 60 µl ÜN bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und nach Reaktionsende ebenfalls deaktiviert.

3.5.6 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Zum Probevolumen wurde gleiches Volumen (1x) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 / 24/ 1) zugegeben und gevortext. Daraufhin wurde 4 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 13000 UPM) und die wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zur wässrigen Phase wurde gleiches Volumen CIA zugegeben, gemischt und 2 min zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Im Anschluß erfolgte die Fällung mit 2fachen Volumen eiskaltem Ethanol abs. bei -20 °C für mindestens 1 h. Dann wurde für 5 min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, und die Reaktionsgefäße auf Küchenpapier abgetropft. Das Pellet wurde dann für 10 min im Vakuum (Speed Vac) getrocknet.

3.5.7 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wird die T4 DNA Ligase verwendet, da mit diesem Enzym sowohl komplementäre überhängenden Enden als auch glatte Enden ligiert werden können.

3.5.7.1 Ligation an glatten Enden

Für die Ligation von glatten Enden wurde zuerst die Konzentration von Vektor und Insert (Kapitel 3.5.3) bestimmt. Die Ligation erfolgte im Verhältnis von 1:1, 1:2 bzw. 1:6 Vektor zu Insert unter Berücksichtigung der molaren Größen. Beide Komponenten wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, mit dem 1fachen Volumen 2 M LiCl und dem 2fachen Volumen eiskalten absoluten Ethanol gefällt und getrocknet (Kapitel 3.5.6).

Der Ligationsansatz für glatte Enden setzte sich wie folgt zusammen:

Vektor und Insert	getrocknet
	t
Ligasepuffer 10 x	3 µl
Ligase	3 µl
H ₂ O steril	ad 30 µl

Die Ligation erfolgte bei 18 °C ÜN. Die Ligase wurde für 15 min bei 65 °C deaktiviert.

3.5.7.2 Ligation an überhängenden Enden

Die Ligation von überhängenden Enden wurde wie in Kapitel 3.6.6.1 beschrieben durchgeführt. Folgende Änderungen wurden vorgenommen: Die Zugabe der Ligase wurde im Ligationsansatz auf 2 µl verringert und die Ligation erfolgte bei 20 °C für 4 h. Änderungen von den hier angegebenen Methoden in den Kapiteln 3.5.4 – 3.5.6 werden im Kapitel Ergebnisse an betreffender Stelle vermerkt.

3.5.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine in vitro Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente dar (Mullis et al., 1986). Zuerst wird zur Trennung des Doppelstrangs in

zwei Einzelstränge der DNA-Matrize ein Denaturierungsschritt durchgeführt. Durch die Erniedrigung der Temperatur kann es zur Hybridisierung der Primer kommen. Die Sequenzspezifität einer Matrize aus einem DNA-Gemisch basiert auf den Einsatz bestimmter Primerpaare, die sich an die komplementäre Sequenz der eingesetzten Matrize anlagern (Annealing). Zwischen den Primerpaaren kann die thermostabile DNA-Polymerase den gewünschten Abschnitt der DNA verlängern (Elongation). Durch Wiederholung dieser Zyklen ist die Amplifikation exponentiell (Stryer, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PCR-Bedingungen nach Länge und GC-Gehalt der Primer und Länge der zu amplifizierenden Sequenz variiert. Das Gesamtvolumen der Reaktionen betrug in der Regel 40 µl und enthielt folgende Komponenten:

10x PCR-Puffer (MgCl 25 mM)	4µl
dNTP-Mix (10 mM)	1µl
Primer (forward)	1µl
Primer (reverse)	1µl
Pfu-Polymerase	1µl
Matrizen DNA (cDNA)	2µl
H ₂ O steril	ad 40 µl

Die Amplifikation erfolgte bei folgenden Bedingungen:

1. initiative Denaturierung	94 °C	4 min
2. Denaturierung	94 °C	30 sek
3. Anlagerung	60 °C	45 sek
4. Extension	72 °C	5 min
5. terminale Extension	72 °C	10 min

Schritt 2 – 4 wurde in 35 Zyklen wiederholt. Die Anzahl der Zyklen und die Schritte Anlagerung und Extension variierten bei den verschiedenen Versuchen. Besonders bei der Anlagerung wurden je nach Primer verschiedene Temperaturen gewählt.

Die Schmelztemperatur T_m der Primer wurde nach der empirischen Formel 2 berechnet. Dabei wird sowohl der relative molare GC-Gehalt (% GC) als auch die Länge der Primer n berücksichtigt.

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times \%GC - 650 / n$$

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers

T_m : Schmelztemperatur (°C); % GC: relativer molarer GC-Gehalt
des Primers n : Anzahl der Basen des Primers

Die Temperatur der Anlagerung (Schritt 3) wurde in der Regel so gewählt, daß sie zwischen 2 und 4 °C unter dem T_m des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur lag. Prinzipiell wurde bei jeder PCR der Heizblock auf 94 °C, der Temperatur für die Denaturierung, vorgeheizt (Hot start). Dadurch sollte verhindert werden, daß während des Aufheizens des PCR-Cyclers am Anfang der Reaktion die Primer bei tieferen Temperaturen unspezifisch an die DNA anlagern und von der Polymerase verlängert werden.

Nach Beendigung der Zyklen wurde der Reaktionsansatz im Heizblock bei 0 °C bis zur Entnahme belassen.

Das PCR Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid (Kapitel 3.5.4) analysiert.

Abweichungen von der Zusammensetzung des Ansatzes und PCR-Bedingungen werden beim jeweiligen Versuch gesondert aufgeführt.

3.5.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg). Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz wurden die DNA-Abschnitte in den entsprechenden

Vektoren mittels Miniprep-Plasmidisolation (Kapitel 3.5.1) isoliert und mit der Speed-Vac RC 10.10 (Jouan) im Vakuum dehydratisiert. Für die Sequenzierung bei MWG wurde das Kettenabbruchverfahren verwendet (Sanger et al., 1977). Dazu wurden verschiedene mit Fluoreszenzfarbstoff markierte 2'3'-Didesoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der Thermal Cycle Sequencing Reaktion (Slatko, 1994) verwendet. Dadurch kommt es bei der Strangsynthese durch die Polymerase zu zufälligen Fragmenten, die am 3'-Ende mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Die auf diese Weise erhaltenen Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das endständige Nukleotid anhand seiner Fluoreszenzeigenschaften detektiert. Die eingesetzte Menge an DNA betrug 1 µg. Die Primer wurden im Falle von T7 forward und T7 reverse von der Firma MWG gestellt. Alle anderen Primer wurden in der Konzentration 10 µg/µl in Volumen von 10 µl MWG zugesandt.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Proteinproduktion

Für das zu exprimierende Protein wurde der Vektor pET 24 (a) + benutzt (Kapitel 2.8). Diese Vektoren stehen unter der Kontrolle des T7 Promoter- und lac- Operator- Systems. Mit einer frisch transformierten *E. coli* BL 21(DE3) codon+ Kolonie wurden als Vorkultur 5 ml LB Medium mit Kanamycin plus Chloramphenicol bei 37 °C ÜN inkubiert. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Tag weitere 20 ml LB-Medium mit oben genannten Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 125 Upm. geschüttelt. Dann wurde der Ansatz auf zwei Kolben verteilt und in einem Ansatz die Expression mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. In dem anderen Ansatz wurde kein IPTG zugegeben.

Nach Wachstum ÜN wurden die Zellen durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge 17 RS, 10 min 4000 Upm und 4 °C) pelletiert. Die Resuspension erfolgte in 1 ml Aufschlußpuffer (100 mM, Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl₂). Dann wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson

Digital Sonifier 250, Amplitude 20 %, 1 min auf Eis) aufgeschlossen. Es wurden Aliquots (100 µl, P/C Pellet / löslicher Zellextrakt) der Suspensionen entnommen. Die Aliquots wurden pelletiert (Heraeus Biofuge 17 RS, 5 min, 13000 Upm und 4 °C). Der Überstand von P/C wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (löslicher Zellextrakt) und das Pellet in entsprechenden Volumen-Auflösungspuffer resuspendiert (Pellet P). Die Proben wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -80 °C gelagert.

3.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur PAGE unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Bei dieser Methode (modifiziert nach Laemmli, 1970) wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 versetzt und für 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Die auf diese Weise denaturierten Proteine bilden mit SDS große mizellartige Komplexe. SDS interagiert mit hydrophoben Regionen der Proteine und bewirkt eine partielle Auffaltung. Die vielen negativen Ladungen der SDS-Moleküle bestimmen im wesentlichen die Gesamtladung; die Nettoladung des Proteins ist vernachlässigbar. Die negative Gesamtladung der Komplexe entsprach der Größe der Proteine. Man ging dabei von einem SDS-Molekül auf zwei Aminosäureresten aus. Die Auftrennung erfolgt aufgrund der Retention der Komplexe nach ihrer Größe.

Zur Auftrennung der Proteine wurden Biometra-Minigelapparaturen benutzt. Zuerst wurde das Trenngel (10 %) zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Acryl/Bisacrylamids wurde das Isopropanol wieder abdekantiert. Auf dieses Trenngel wurde dann das Sammelgel gegossen und ein Teflonkamm zur Ausbildung von Sammeltaschen in das noch flüssige Sammelgel gedrückt. Es wurden Kämmen mit 12 Taschen und 25 µl Probevolumen verwendet.

Die Lösungen für die Herstellung der Trenn- bzw. Sammelgele hatten folgende Komponenten:

Stammlösung	Trenngel (10%)	Sammelgel(5%)
40 %Acryl-/ 1% Bisacrylamid	1500 µl	310 µl
0,5 M Tris / HCl (pH 6,8)	-----	500 µl
1,5 M Tris / HCl (pH 8,8)	1500 µl	-----
10 % SDS	60 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl
H ₂ O bidest.	2900 µl	1645 µl
10 % APS	30 µl	15 µl

Tabelle 5: Lösungen für SDS Polyacrylamidgele

Sobald das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Gelplatten in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Diese wurde dann mit SDS Laufpuffer aufgefüllt und die in SDS Probenpuffer für 5 min erhitzten Proteinproben in die Sammeltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Molekularmasse wurden sowohl HMW- als auch LMW-Marker verwendet.

Der Elektrophoreselauf wurde solange bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel durchgeführt, bis die Laufront (als blaue Bande des Bromphenolblau = Laufindikator) in das Trenngel eingewandert war. Anschließend wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht. Hatte der Indikator den unteren Rand des Gels erreicht, war die Elektrophorese beendet.

3.6.3 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

3.6.3.1 Coomassiefärbung (Hames, 1990)

Die Gele wurden reversibel durch Schwenken in Coomassielösung (15 - 30 min) gefärbt.

Die Färbelösung hatte folgende Komponenten:

Bestandteil de Färbelösung	Volumen (%)
Coomassie-Brillant Blue G 250	0,1 %
Methanol	50 %
Eisessig	10 %
H ₂ O	ad 100 %

Tabelle 6: Färbelösung für Coomassiefärbung

Die Entfärbung wurde in Methanol (50 %) und Eisessig (10 %) für 5 - 15 min durchgeführt.

3.6.3.2 Silberfärbung (Heukeshoven & Dernik, 1988)

Durch Reduktion der Silberkationen mit Formaldehyd im alkalischen Milieu wurden die Proteine im Gel als braune bis schwarze Banden sichtbar.

Die Silberfärbung wurde in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

Arbeitsschritt	Lösungen	Inkubationszeitraum
Fixieren	30 % Ethanol 10 % Essigsäure	30 min
Inkubieren	30 % Ethanol 0,4 Natriumacetat 0,2 % Na_2SO_3 0,5 % Glutaraldehyd (pH 6,0)	mind. 1 h oder ÜN
Waschen	H_2O bidest.	3 x 20 min
Silbern	0,1 % AgNO_3 0,02 % Formaldehyd	45 min
Entwickeln	2,5 % Na_2CO_3 0,01% Formaldehyd (pH 11,3-11,8)	1 - 5 min
Stoppen	5 % Essigsäure	10 min
Waschen	H_2O bidest.	3 x 10 min

Tabelle 7: Silberfärbung

Silbergefärbte Polyacrylamidgele konnten entfärbt werden. Dies wurde mit rotem Blutlaugensalz durchgeführt. Dazu wurden die Gele 30 min in folgender Lösung inkubiert:

Bestandteil des Entfärbers	Volumen / Masse
rotes Blutlaugensalz	200 mg
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	2 g
H_2O bidest.	ad 200 ml

Tabelle 8: Entfärben von Silbergelen

Nach der Entfärbung wurde 3 x 10 min mit H_2O bidest. gewaschen und mit dem Arbeitsschritt Silbern begonnen.

3.6.4 Western-Blotting

Unter Western-Blot versteht man den Elektronentransfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran (Elektroblot) mit anschließendem immunologischem Nachweis (Towbin et al., 1979). In diesem Fall wurde ein „semy-dry“-Verfahren mit diskontinuierlichem Puffersystem angewendet. Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel für 10 sek in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Membran wurde für 10 sek mit Methanol benetzt und ebenfalls in Kathodenpuffer äquilibriert. Die verwendeten Filterpapiere wurden im jeweiligen Puffer äquilibriert.

Der Elektro-Blot hatte folgenden Aufbau:

Kathode – (Deckel, oben)

2x Filterpapier (Whatman) in Kathodenpuffer äquilibriert

Gel in Kathodenpuffer äquilibriert

Membran in Kathodenpuffer äquilibriert (Millipore Immobilon-p Transfer Membranes)

1x Filterpapier (Whatman) in Anodenpuffer 2 äquilibriert

2x Filterpapier (Whatman) in Anodenpuffer 1 äquilibriert

Anode + (Gehäuse, unten)

Die vorhandenen Luftblasen wurden durch leichtes Abrollen einer Pasteurpipette entfernt. Anschließend wurde die Kathode (Deckel) aufgesetzt und die Apparatur mit einem 1 kg-Gewicht beschwert. Mit einer Stromstärke von $2,5 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche (120 mA pro Gel) erfolgte der Transfer auf die Membran, da die Proteine bei diesem pH-Wert aus dem Gel in Richtung Anode wanderten. Nach 90 min wurde der Transfer abgebrochen und die Membran aus der Apparatur in eine Plastikschiene überführt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt und die sichtbaren Banden der verwendeten Markerproteine mit einem Stift markiert. Die Membran wurde dann durch Schwenken in 1 x PBS für etwa 10 min vollständig entfärbt.

Danach folgte die immunologische Detektion der gesuchten Proteine auf der Membran in folgenden Schritten:

Arbeitsschritt	Lösungen	Inkubationszeitraum
Blockieren	5 % Magermilchpulver / 1x PBS	45 min oder ÜN
Inkubieren	Antikörper p97 (1:1250 in Magermilchpulver / 1xPBS)	90 min
Waschen	1 x PBS	3 x 10 min
Inkubieren	Antikörper Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase(1:1250 in Magermilchpulver / 1x PBS)	90 min
Waschen	1 x PBS	3 x 10 min

Tabelle 9: Immunologische Detektion

Die immunpositiven Banden wurden mit Hilfe der Luminiszenzmethode unter Verwendung von „Nowa“-Reagenz sichtbar gemacht. Dazu wurden 3 ml einer 1:1-Mischung der Lösung von Nowa A und Nowa B hergestellt und für 1 min inkubiert. Daraufhin ließ man die Membran abtropfen und gab sie in eine Fotokassette.

In der Dunkelkammer wurde dann ein Film aufgelegt und je nach Bedarf etwa 10 sek bis 2 min belichtet und anschließend entwickelt und fixiert.

3.6.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Commassie Brilliant Blue G 250 verschiebt sich bei der Bindung an aromatische oder basische Aminosäuren von 465 nm auf 595 nm. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine BSA-Standardverdünnungsreihe verwendet und zwar mit den Konzentration 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; und 0,7 mg/ml. Als optische Referenz wurde

das Bradford-Reagenz verwendet und eine den Proben entsprechende Menge bidest. Wasser zugegeben.

Das Bradford Reagenz setzte sich folgendermaßen zusammen:

100 mg Commassie Blue G 250

50 ml 95 % EtOH

100 ml 85 % H_3PO_4

850 ml H_2O bidest.

Zu 1 ml Bradford-Reagenz wurden in einem Eppendorfgefäß 20 µl Standardlösung oder 20 µl Probe versetzt. Waren die Proben zu stark konzentriert, wurden sie vorher entsprechend verdünnt. Als Referenz dienten 1ml Bradford-Reagenz, das mit 20 µl bidest. Wasser versetzt und gemischt wurde. Es wurde für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Absorption bei 595 nm in einer Küvette gemessen.

3.7 Standardisierung der Meßmethode

Um eine Beeinflussung der Messungen durch unkontrollierte Faktoren zu unterbinden, wurden alle Versuche in einem modifizierten Brutschrank (Brandmaier, 2003) bei konstanter Temperatur von 24 °C durchgeführt. Der Brutschrank war mit einer selbstgebauten Beleuchtungseinrichtung versehen, in der verschieden Filter eingebaut wurden. Ebenso besaß er einen Schüttler, um die Plasmodien gut mit Exportpuffer zu umspülen.

3.8 Ernte und Waschung bei Exportversuchen

Die Versuche zur Exportkinetik von PMLA und Polymalatase wurden in der Regel mit zwei Tage alten Mikroplasmodien des Stamms M₃CVII durchgeführt. Dabei wurde bis zur Probeentnahme nach dem gleichen Versuchsprotokoll gearbeitet.

Alle Arbeiten des Versuchsprotokolls wurden unter Ausschluß von Licht durchgeführt.

Änderungen vom Standardprotokoll werden beim jeweiligen Versuch vermerkt.

Der zwei Tage alte Stamm wurde in vorher abgewogenen 50 ml Erlenmeyerkolben gefüllt. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgegossen und entfernt. Die Zellen wurden auf 2 g Naßgewicht eingewogen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml pro g Zellen des jeweiligen Export-Puffers gewaschen.

Das Export-Experiment beginnt, wenn die Zellen in dem jeweiligen Versuchsmedium bis zu einer Zelldichte von 0,4 g/ml suspendiert werden ($t = 0$). Proben (20 oder 100 μ l) des Export-Puffers oder der Zellen werden zu verschiedenen Zeiten entnommen.

3.9 Enzymatische Tests

3.9.1 Quantitative Bestimmung von L-Malat

Diese Nachweismethode (modifiziert nach Gutmann & Wahlefeld, 1974) beruht auf der enzymatischen Oxidation von L-Malat zu Oxalacetat durch das Enzym Malatdehydrogenase und der damit verbundenen Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ . Dabei entsprach die Menge an umgesetzten L-Malat stöchiometrisch der Menge an gebildeten NADH/H^+ .

Dieses wurde mit dem Fluoreszenz-Spectrophotometer (Emission $\lambda = 455$ nm/Extinktion $\lambda = 340$ nm) gemessen.

Da bei dieser Reaktion das Gleichgewicht auf der Seite von L- Malat und NAD^+ lag, wurden freigesetzte Protonen durch das alkalische Milieu und Oxalacetat durch

Umsetzung zu Oxalacetat - Hydrazon aus dem Gleichgewicht entfernt. Dadurch wurde eine vollständige Umsetzung von L-Malat ermöglicht.

Reaktion:

MDH

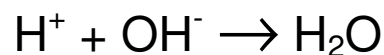


Abbildung 9: Enzymatischer Test auf L-Malat

Testansatz	Volumen (µl)
Glycin Hydrazin - Puffer pH 9.0	720
NAD ⁺ (40 mM)	80
Probe	20 - 100
H ₂ O bidest.	ad 1000

Tabelle 10: Test auf L-Malat

Der Testansatz wird in die Küvette bei laufendem Fluorimeter pipettiert und gewartet, bis die Basislinie konstant ist. Dann werden 10 µl MDH (5 mg/ml, im Verhältnis 1:10 mit 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 verdünnt) zugegeben. Die Reaktion wird bis zur Einstellung des Gleichgewichts (eine konstante Basislinie) abgewartet. Dann erfolgte die Eichung durch Zugabe von 2 µl L-Malat bei einer Endkonzentration von 0,1-1,0 µg L-Malat. Auch hier wird die Zunahme der Fluoreszenz bis zur Konstanz gemessen. Mit Hilfe der Eichung wird die Masse an L-Malat berechnet.

Nach der Hydrolyse für 60 min bei 37 °C wurden 500 µl Glycin/NaOH-Puffer (pH 9) zugegeben. Die Messung erfolgte im Photometer bei 400 nm. Als Referenz diente der in Tabelle 10 angegebene Ansatz mit Wasser als Probe.

3.9.2 Quantitativer Nachweis von PMLA

Zweimal 100 µl Proben ohne Zellen werden aus dem Export-Puffer Überstand zu den jeweils erforderlichen Zeitpunkten entnommen. Mit der ersten Probe wird sofort ein L-Malattest durchgeführt (E_1 -Wert). Die zweite Probe wird mit 100 µl 2 M H_2SO_4 versetzt und 90 min bei 100 ° C inkubiert. Dabei wird PMLA zu L-Malat hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wird mit 50 µl 1M Tris / HCl pH 7,5 und 78 µl 5M NaOH neutralisiert und analog zum ersten Ansatz ein L-Malattest durchgeführt (E_2 -Wert). Aus der Differenz dieser beiden Werte ($E_2 - E_1$) ergibt sich der Gehalt an PMLA.

Bei Probeentnahmen unter 1 h entfiel die Ermittlung des E_1 -Wertes, da dieser in diesem Zeitraum vernachlässigbar gering war. Bei der Testung ist zu beachten, daß 1 - 4 % des Malats als Fumarat dem Nachweis entgeht.

3.9.3 Test auf PMLA-Hydrolase (Polymalatase-Aktivität)

Zu den gewünschten Zeiten werden 2 x 20 µl Proben aus dem Überstand entnommen. Mit der ersten Probe wird sofort ein L-Malattest durchgeführt ($t = 0$ -Wert). Die zweite Probe wird wie folgt auf Polymalatase Aktivität getestet:

Bestandteil	Volumen (µl)
Natriumacetat-Puffer (40mM, pH 4,5)	200
H ₂ O bidest.	75
PMLA (30 mg/ml)	5
Probe	20

Tabelle 11: Test auf Polymalatase

Dieser Ansatz wird für 90 min bei 28 °C im Thermoblock inkubiert. Die Reaktion wird mit 28 µl di-Kaliumhydrogenphosphat durch Anhebung des pH-Wertes gestoppt. Mit einem Aliquot wird L-Malattest durchgeführt. Aus der Differenz der $t = 0$ -Werte wird die

Aktivität der PMLA-Hydrolase berechnet. Die Spontanhydrolyse von PLMA unter den gegebenen Bedingungen ist vernachlässigbar gering (Korherr, 1993).

Als Aktivitätseinheit wurde festgelegt:

1U = 1 µg freigesetztes L-Malat pro h.

3.10 Bestimmung der Überlebensrate von Mikroplasmodien bei der Exportmessung

3.10.1 Vorbemerkung

Für Untersuchungen über den Export von PMLA und Polymalatase war der Zustand der Zellen im jeweiligen Medium von entscheidender Bedeutung. Jedem Versuch zum Export ging eine Untersuchung einer möglichen zellschädigenden Wirkung des jeweilig benutzten Export-Puffers voraus. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Bei der ersten Methode wurden die toten Zellen mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Die zweite Methode beruhte auf der Bestimmung des ausgelaufenen gelben Pigments. Dieses besaß ein Absorptionsmaximum bei etwa 380 nm. Durch seine Konzentration im Überstand relativ zur Gesamtkonzentration nach Lyse aller Zellen konnte auf den Grad der Intaktheit der Zellen geschlossen werden. Abweichungen zu den beiden folgenden Protokollen wurden bei den jeweiligen Abschnitten vermerkt.

3.10.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Auszählung (Trypanblau)

Die Mikroplasmodien wurden wie in Kapitel 3.8 beschrieben geerntet, gewaschen und mit dem jeweiligen zu untersuchenden Export-Puffer versetzt. Anschließend wurden im 10 min-Abständen 100 µl Proben der Zellen aus der homogenen Suspension entnommen. Diese Probe wurde dann mit 5 µl Trypanblau (0,4 % Stammlösung) versetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit je 1 ml von dem

jeweiligen Export-Puffer gewaschen und 7 μ l der Zellsuspension in einer Neugebauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (Leitz; Phasenkontrast 2) ausgezählt. Die toten Zellen konnten dann an ihrer Blaufärbung identifiziert werden. Zusätzlich wurden die intakten gelben Plasmodien sowie die ausgelaufenen weißen Zellen gezählt. Offensichtlich waren nicht alle weißen Zellen, denen das Pigment ausgelaufen war, auch Trypan-positiv.

3.10.3 Bestimmung der Überlebensrate mit Hilfe der photometrischen Bestimmung des ausgelaufenen Pigments

Die Mikroplasmodien wurden ebenfalls wie in Kapitel 3.8 beschrieben geerntet, gewaschen und mit dem jeweiligen Export-Puffer versetzt. In 10 min-Abständen wurden der homogenen Suspension Proben entnommen und auf Eis gestellt. Nach der letzten Probeentnahme bei 60 min wurde die Mikroplasmodienlösung mit Triton X100 (Endkonzentration 1%) versetzt, um den Gesamtgehalt an vorhandenem Pigment nach Totallyse der Plasmodien zu bestimmen. 80 μ l Probe wurden dann mit 920 μ l Tris / HCl (0,1 M; pH 7,5) in eine Küvette gegeben und ein Spektrum zwischen 300nm und 680 nm in einem UV/VIS Spectrophotometer gemessen. Als Referenz diente Tris / HCl (0,1 M; pH 7,5).

Aus der Differenz der Triton X 100 behandelten Zellen und der jeweiligen Probe wurde der Prozentsatz an ausgelaufenen Farbstoff berechnet. Die Lichtstreuungseffekte wurden nicht korrigiert.

4 Ergebnisse

4.1 Exportkinetik von Polymalat und Polymalatase bei Mikroplasmodien mit unterschiedlichen Beleuchtungen

4.1.1 Zielsetzung

Der Export von Polymalat und Polymalatase bei Mikroplasmodien wurde hinsichtlich des Einflusses verschiedener Parameter untersucht. Der Vergleich beider Biomoleküle zeigte ein paralleles Verhalten in der Exportkinetik bezüglich Temperatur, pH-Wert, Hell/Dunkel und Licht verschiedener Wellenlänge (Brandmaier, 2003). Die folgenden Versuche dienen dazu, um das parallele Verhalten beim Export von Polymalat bzw. Polymalatase nach Wechsel der Beleuchtung von Grün auf Weiß bei Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII und die Auswirkungen von Licht verschiedener Wellenlängen auf Mikroplasmodien des Stammes LU 887 zu erweitern.

4.1.2 Export von Polymalat bei Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII mit unterschiedlichen Beleuchtungen

4.1.2.1 Strategie

Bei Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII wurde der Export von Polymalat nach Grün-Weiß-Grün-Belichtung bestimmt. Die Zellen wurden wie im Kapitel 3.8 beschrieben behandelt.

Abweichend von den Standardbedingungen waren die Beleuchtung und die Zeitpunkte der Probenentnahme. Die ersten 30 min wurde der Ansatz mit Grünlicht bestrahlt, dann wurde der Grünlichtfilter entfernt und die Zellen wurden unter Weißlicht inkubiert. Nach 60 min wurde der Grünfilter wieder eingesetzt. Die Probenentnahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 31, 35, 40, 60, 61, 90 und 120 min.

Um die Intaktheit der Mikroplasmodien zu gewährleisten, wurden in Vorversuchen die Lebendzellzahl mittels Trypanblau (Kapitel 3.10.2) und Messung des gelben Farbstoffes (Kapitel 3.10.3) bestimmt.

4.1.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Abbildung 10 zeigt die Anzahl der lebenden und toten Zellen der Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII. Von 0 - 20 min sind keine toten Zellen festzustellen. Ab 30 min steigt die Anzahl der toten Zellen schwach an bis zu einem Maximalwert von etwa 11% bei 120 min. Eine Schädigung durch die Bestrahlung mit Weißlicht zwischen 30 und 60 min konnte nicht festgestellt werden.

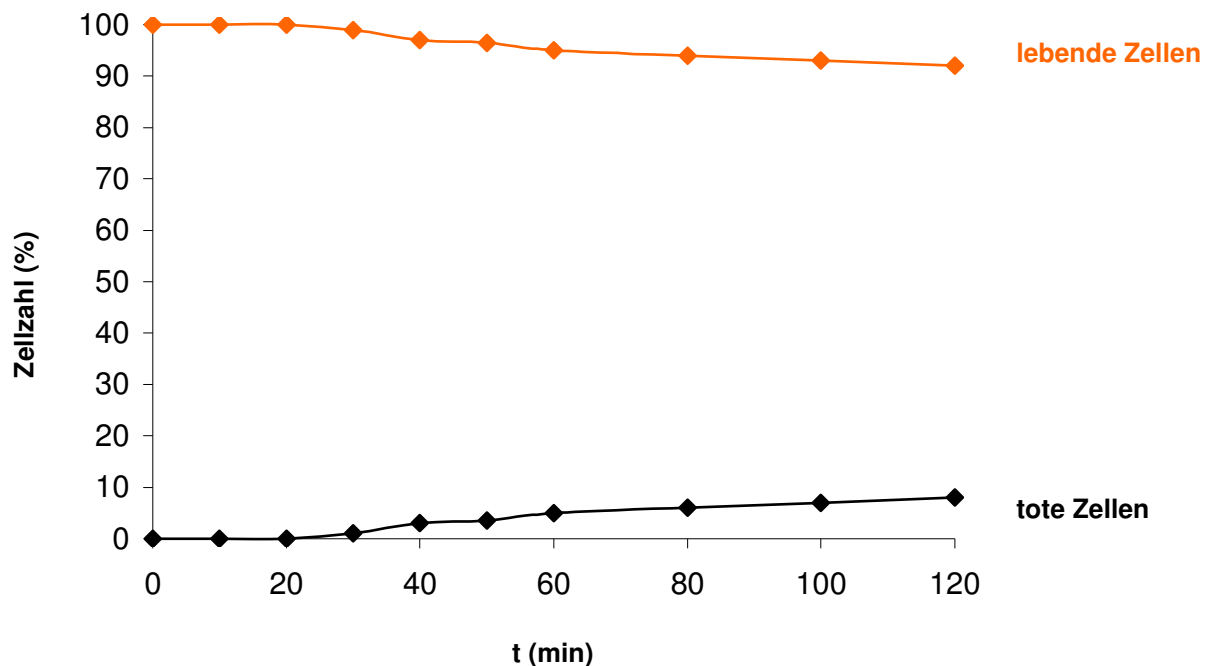


Abbildung 10: Zellzahl (%) von lebenden und toten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, zwischen 30 und 60 min mit Weißlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat 17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215mM). Die Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2) ausgezählt.

4.1.2.3 Messung des gelben Farbstoffes im Überstand

Aufgrund der Beobachtung, daß sich bei geschädigten Zellen von Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII der Puffer gelb färbte, wurde der Schaden der Zellen mit Hilfe des ausgelaufenen Farbstoffs untersucht. Die Messungen erfolgten mit einem UV/VIS-Spectrophotometer. Gemessen wurde ein Spektrum mit einem Wellenlängen-Bereich zwischen 300 nm und 680 nm (Kapitel 3.10.3). Durch Aufbrechen der Zellen mit Triton X (1% Endkonzentration) wurde die Gesamtmenge des gelben Pigments bestimmt (100 %). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes lag bei 380 nm. Durch die Veränderung der Absorbanz bei 380 nm konnte auf die Menge des ausgelaufenen Farbstoffes geschlossen werden. Dadurch waren Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen möglich (Brandmaier, 2003).

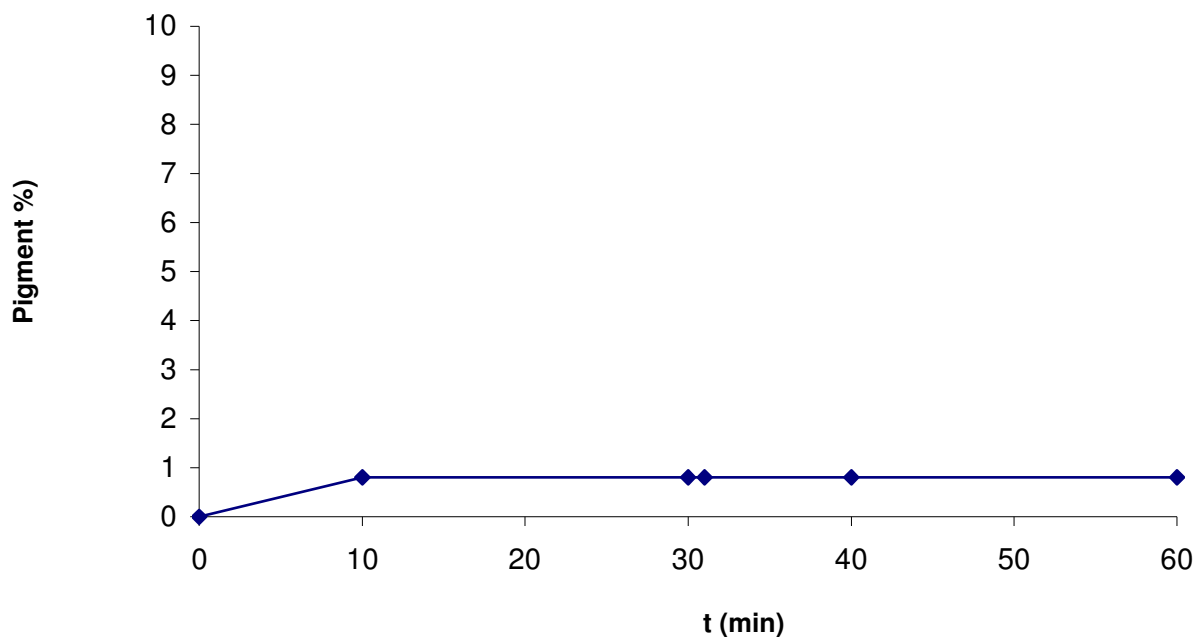


Abbildung 11: Farbstoffausfluß der Zellen (%) unter Grün– Weiß –Grün Beleuchtung in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, zwischen 30 und 60 min Weißlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM).

Abbildung 7 zeigt die Menge an ausgelaufenem Pigment während der Beleuchtung mit Grün–Weiß–Grün.

Im gemessenen Zeitraum von 10 - 60 min betrug der Ausfluß 0,8%. Eine Schädigung der Zellen durch die Weißlichtbestrahlung bis 60 min fand nicht statt.

4.1.2.4 Export von Polymalat nach Grün-Weiß-Grün-Beleuchtung

Der Export von Polymalat bei Grünlicht (Kapitel 3.7) stellte die Standardbeleuchtung bei allen Exportversuchen dar. Der Export änderte sich nicht bei der Bestrahlung mit Rot und Lila. Bei einer Bestrahlung mit Weißlicht war eine Hemmung des Polymalatesports festzustellen (Brandmaier, 2003).

In folgenden Versuchen sollte der Zeitpunkt der Hemmung eingegrenzt werden und überprüft werden, ob die Hemmung durch erneute Bestrahlung mit Grünlicht aufgehoben werden konnte.

Abbildung 12 zeigt den Einfluß von Weißlicht auf den Export von Polymalat. Während der ersten 30 min wurden die Mikroplasmodien mit Grünlicht bestrahlt. Die Exportrate mit etwa 600 µg L-Malat/h x g Zellen stimmt mit der unter Grünlicht erwarteten Exportrate überein (Brandmaier, 2003). Nach 30 min wurde der Grünfilter entfernt und die Zellen mit Weißlicht inkubiert. Polymalat wurde nicht mehr exportiert. Die Hemmung erfolgte innerhalb von 2 und 4 min Inkubationszeit. Durch die erneute Bestrahlung mit Grünlicht konnte die Hemmung nicht wieder aufgehoben werden.

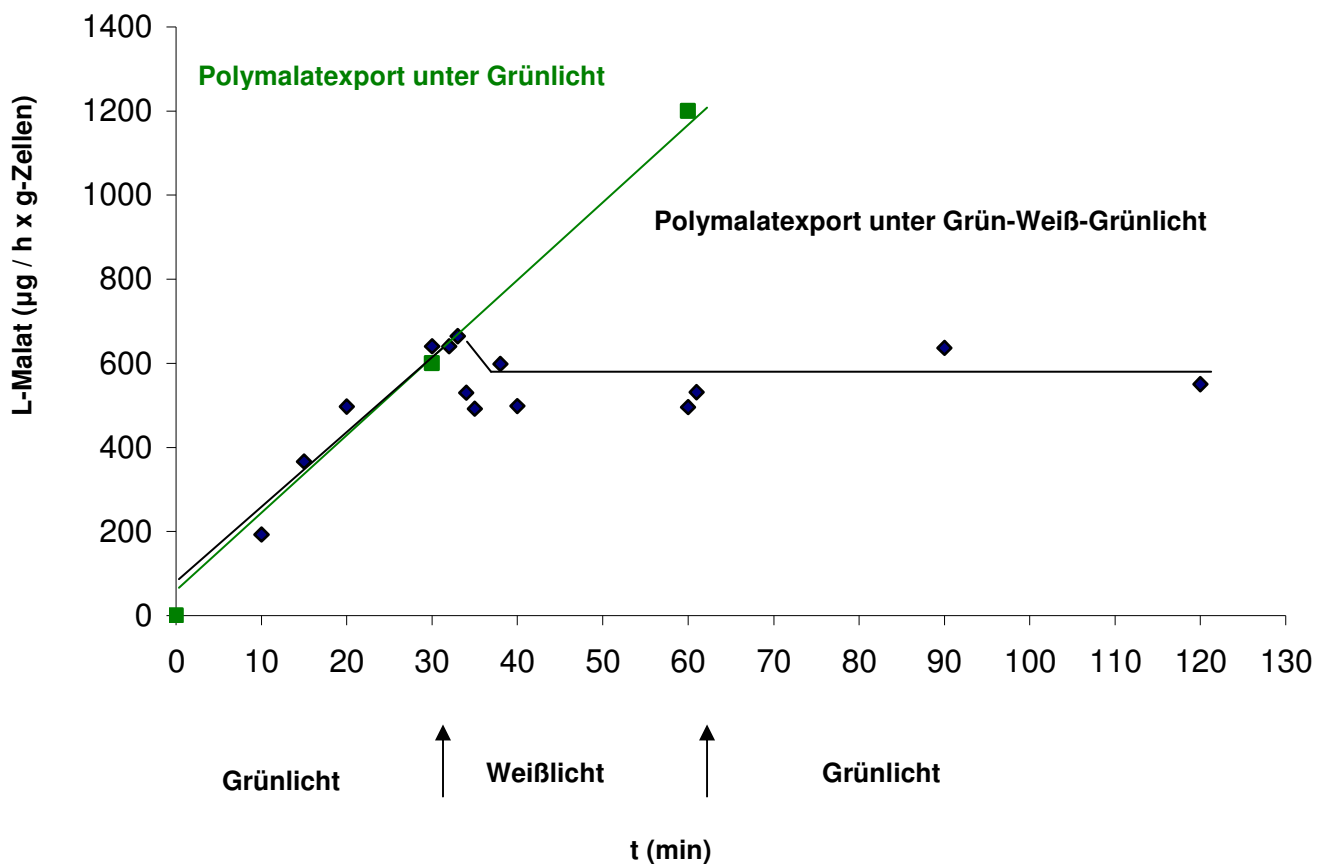


Abbildung 12: Abhängigkeit des Polymalat-Exports von Grün-Weiß-Grüner Beleuchtung in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, zwischen 30 und 60 min Weißlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM). Spektren der Filter: weiß: ohne Filter Osram Energiesparlampe 100 Watt; grün: 470 - 500 nm Wellenlänge.

4.1.3 Export von Polymalat bei Mikroplasmodien des Stammes LU 887 mit unterschiedlicher Beleuchtungen

4.1.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Intaktheit der weißen Mikroplasmodien zu gewährleisten, wurden die Lebendzellzahl mit Trypanblau unter lila und roter Beleuchtung bestimmt. Die

Versuche wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Der normal verwendete Grünfilter (470 - 560 nm) wurde jeweils durch lila Filter (400 - 460 nm) bzw. roten Filter (590 - 640 nm) ersetzt.

Lebendzellzahl unter lila Beleuchtung (400 nm-460 nm)

Zeit (min)	0	10	20	30	40	50	60
Lebendige Zellen (%)	98,5	97,7	97,3	95,2	95,0	94,5	93,0

Tabelle 12: Lebendzellzahl unter lila Beleuchtung nach Messung mit Trypanblau

Lebendzellzahl unter roter Beleuchtung (590 nm-640 nm)

Zeit (min)	0	10	20	30	40	50	60
Lebendige Zellen (%)	92,8	94,7	94,9	93,6	92,9	94,5	92,6

Tabelle 13: Lebendzellzahl unter roter Beleuchtung nach Messung mit Trypanblau

Bei der Lebendzellzahlbestimmung unter lila Beleuchtung und unter roter Beleuchtung konnte keine größere Schädigung der Zellen festgestellt werden. Nach 60 min waren die Zellen zu etwa 7 % geschädigt. Somit war eine Exportmessung von Polymalat für den Stamm LU 887 sinnvoll.

4.1.3.2 Export von Polymalat mit unterschiedlichen Beleuchtungen

Die Versuche wurden mit weißen Mikroplasmodien des Stammes LU 887 durchgeführt. Der Versuchsablauf erfolgte nach Standardprotokoll (Abschnitt 3.8). Der Grünlichtfilter wurde gegen Lilafilter bzw. Rotlichtfilter ausgetauscht.

In Abbildung 13 sehen wir den Export von Polymalat bei Mikroplasmodien des Stammes LU 887 bei Grünlicht in Abhängigkeit von der Zeit. Die weißen Mikroplasmodien exportieren etwa 160 μg Malat/h x g Zellen. Unter Rotlichtbestrahlung wird in etwa dieselbe Menge an Polymalat exportiert. Unter Bestrahlung mit Lila wird der Export bei weißen Mikroplasmodien jedoch gehemmt. Bemerkenswert ist, daß der Export von Polymalat bei gelben Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII hingegen nicht von Blaulicht gehemmt wird.

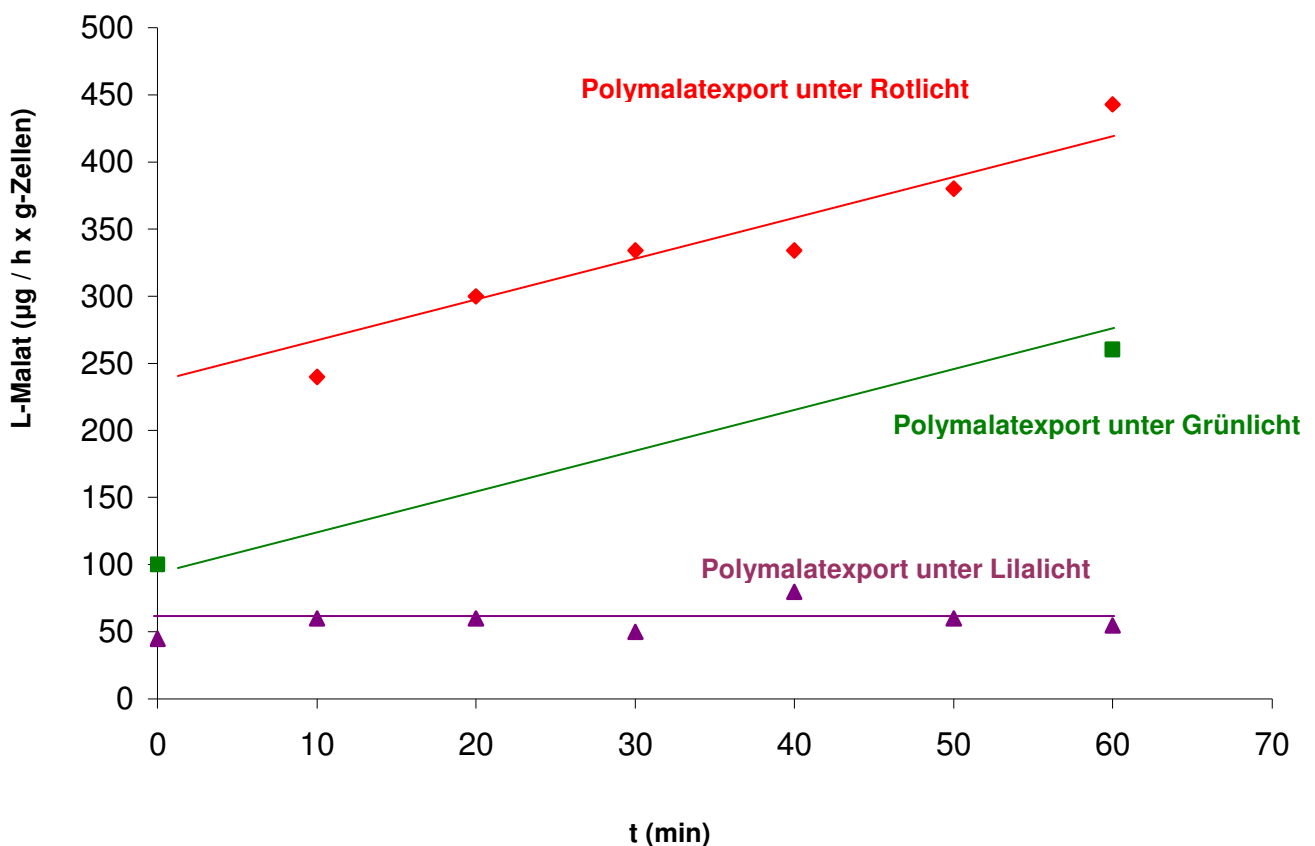


Abbildung 13: Abhängigkeit des Polymalat-Exports von der Zeit unter roter bzw. lila Beleuchtung. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes LU 887 unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und rote bzw. lila Beleuchtung verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM). Spektren der Filter: grün 470 - 560 nm, lila 400 - 460 nm, rot 590 - 640 nm.

4.2 Malatgehalt von weißen und gelben Mikroplasmodien

Die Mikroplasmodien der Stämme M₃CVII (gelb) und LU 887 (weiß) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Exportrate. Während die gelben Zellen unter Standardbedingungen etwa 1200 µg Malat/h x g Zellen exportieren, findet man bei weißen Zellen lediglich 160 µg Malat/h x g Zellen. Da der Grundbaustein für Polymalat L-Malat darstellt, könnte ein Grund hierfür der geringere Malatgehalt von weißen Mikroplasmodien im Vergleich zu gelben Mikroplasmodien sein.

Dazu wurde ein fraktionierter Zellaufschluß durchgeführt (Kapitel 3.3.2.2). Im Zuge dieses Zellaufschlusses erhielt man zwei Pellets und zwei Überstände. Überstand 1 (Ü1) beinhaltete das Cytoplasma + Membransuspensionen (ER, Golgi und Cytoplasmamembran).

Pellet 1 (P1) stellte die Zellkerne und die restlichen ganzen Zellen, Überstand 2 (Ü2) das Cytoplasma und Pellet 2 (P2) die Cytoplasmamembran u.a. Membranen dar.

Proteingehalt der Fraktionen

bei gelben Mikroplasmodien

Aufschlußfraktion	c/(mg/g Zellen)	% an Gesamt-Protein
P1	2,0 ± 0,2	8,9
Ü1	11,0 ± 1,3	44,7
P2	0,8 ± 0,1	3,3
Ü2	10,6 ± 1,9	43,1
Gesamt	24,6 ± 3,5	100

Tabelle 14: Proteingehalt der Fraktionen von gelben Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII mittels Proteinbestimmung nach Bradford. Es wurde jeweils mit zwei Fraktionen jedes Typs die Proteinbestimmung durchgeführt und der Mittelwert beider Proben berechnet.

bei weißen Mikroplasmodien

Aufschlußfraktion	c/(mg/g Zellen)	% an Gesamt-Protein
P1	1,1 ± 0,2	5
Ü1	9,3 ± 0,9	42
P2	1,0 ± 0,1	5
Ü2	10,5 ± 1,1	48
Gesamt	21,9 ± 2,3	100

Tabelle 15: Proteingehalt der Fraktionen von weißen Mikroplasmodien des Stammes LU 887 mittels Proteinbestimmung nach Bradford. Es wurde jeweils mit zwei Fraktionen jedes Typs die Proteinbestimmung durchgeführt und der Mittelwert beider Proben berechnet.

Für die verschiedenen Fraktionen wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Die Tabellen geben den Proteingehalt der verschiedenen Fraktionen an. Die Proteinkonzentrationen wurden zur Übersicht in die Tabellen 14 und 15 eingefügt.

Hinsichtlich des Proteingehalts der Fraktionen ist zwischen den gelben Zellen und den weißen Zellen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die ermittelten Werte für den Proteingehalt sind sowohl hinsichtlich ihrer Verteilung in den Fraktionen als auch in ihrer jeweiligen Konzentration mit früheren Untersuchungen vergleichbar (Brandmaier, 2003).

Tabelle 16 und Tabelle 17 zeigen den Gehalt an L-Malat von gelben Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII und weißen Mikroplasmodien des Stammes LU 887.

Der Vergleich des Gesamtgehalts der Mikroplasmodien an Malat in gelben und weißen Zellen zeigt einen Unterschied. In gelben finden sich etwa 483 µg Malat/g Zellen bzw. 20,1 µg/mg Protein im Vergleich zu weißen Mikroplasmodien mit 254 µg Malat/g Zellen bzw. 11,6 µg/mg Protein.

Gelbe Mikroplasmodien

Aufschlußfraktion	Gewicht (g)	Proteinanteil (mg/g Zellen)	L-Malat (µg/g Zellen)
P1	0,70	1,9 ± 0,3	21 ± 2,3
Ü1	4,46	11,0 ± 1,5	222 ± 42
P2	0,27	0,8 ± 0,1	24 ± 3,1
Ü2	4,00	10,6 ± 0,9	216 ± 19
Summe/g Zellen		24,0 ± 2,8	483 ± 66

Tabelle 16: Übersicht über die Proteinmenge und den Malatgehalt der verschiedenen Fraktionen zwei Tage alter gelber Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII nach fraktioniertem Zellaufschluß (Kapitel 3.2.2.1). Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (Kapitel 3.6.5). P1= Zellkerne und restliche ganze Zellen; Ü1= Cytoplasma +Membransuspension (ER, Golgi und Cytoplasmamembran); P2= Cytoplasmamembran u.a. Membrane; Ü2= Cytoplasma.

Weiße Mikroplasmodien

Aufschlußfraktion	Gewicht (g)	Proteinanteil (mg/g Zellen)	L-Malat (µg/g Zellen)
P1	0,09	1,1 ± 0,1	7 ± 0,8
Ü1	1,8	9,3 ± 1,6	85 ± 14
P2	0,11	1,0 ± 0,2	4 ± 0,5
Ü2	2,1	10,5 ± 0,9	158 ± 25
Summe/g Zellen		21,9 ± 2,8	254 ± 40

Tabelle 17: Malat Gehalt der verschiedenen Aufschlußfraktionen aus weißen Mikroplasmodien des Stammes LU 887 wie in Tabelle 18. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. P1= Zellkerne und restliche ganze Zellen; Ü1= Cytoplasma +Membransuspension (ER, Golgi und Cytoplasmamembran); P2= Cytoplasmamembran u. a. Membrane; Ü2= Cytoplasma.

Der Malatgehalt der weißen Zellen stimmte mit Werten früherer Arbeiten überein. So fanden sich durchschnittlich 260 µg Malat/1g Mikroplasmodien (Karl & Holler, 2004). Bemerkenswert ist auch der Sachverhalt, daß der Malatgehalt bei gelben Mikroplasmodien mit dem Gehalt an Polymalat vergleichbar ist. Der Malatgehalt betrug etwa 483 µg Malat/1g Mikroplasmodien. Der Polymalatgehalt der gelben Zellen wurde

durchschnittlich auf etwa 450 µg PMLA/1g Mikroplasmodien (Schmidt et al., 1996) bestimmt.

Ein Vergleich der Tabellen 16 und 17 zeigt, daß sich die gelben Zellen von weißen Zellen hinsichtlich ihres Proteinanteils sowohl in der Summe / g Zellen als auch den jeweiligen Fraktionen kaum unterscheiden.

Im Bezug auf den Malat-Gehalt gibt es einen erkennbaren Unterschied. Die weißen Zellen des Stammes LU 887 besitzen nur etwa 50 % des Malatgehalts der gelben Zellen des Stammes M₃CVII. Da aber die gelben Mikroplasmodien etwa um den Faktor 7,5 mehr Polymalat exportieren als die weißen Mikroplasmodien, ist der geringere Malatgehalt nicht der einzige Grund für den geringeren Export.

4.3 Einfluß von Proteaseinhibitoren auf den Export von Polymalat und Polymalatase

4.3.1 Zielsetzung

Nach dem derzeitigen Wissenstand wird die Polymalatase an das Außenmedium sezerniert und anschließend von einem, über den Golgi-Apparat exportierten Faktor aktiviert. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Faktor um eine Protease handelte, wurde die Aktivierung der exportierten Polymalatase nach Zugabe eines Proteaseinhibitorcocktails (Kapitel 2.6.7) untersucht. Eine Protease lag nahe, da auf der cDNA-Sequenz für Polymalatase eine PA- Domäne, also eine Proteinassoziierte Domäne lokalisiert wurde. Diese Domäne stellt eine Insert-Domäne in verschiedenen Proteasen dar.

Um zu überprüfen, ob Proteasen und verbundene Polymalatase auch einen Einfluß auf den Export von Polymalat besitzen, wurde ebenfalls der Gehalt an Polymalat im Kulturüberstand in Abhängigkeit von der Zugabe der Proteaseinhibitoren ermittelt. Zuvor wurde die optimale Proteaseinhibitorkonzentration bestimmt.

4.3.2 Bestimmung der optimalen Hemmkonzentration

Mit der folgenden Untersuchung galt es die Konzentration an Proteaseninhibitoren zu bestimmen, bei der eine Hemmung von Proteasen gewährleistet war und die Zellen nicht geschädigt wurden. Dabei wurde als Ausgangswert die Konzentration gewählt, die beim fraktionierten Zellaufschluß (Kapitel 3.3.2.2) benutzt wurde. Das entsprach bei 5 ml Exportpuffer einer Zugabe von 200 µl Proteaseinhibitorcocktail (Kapitel 2.6.7). Es wurde die Konzentration des gelben Farbstoffes im Überstand bestimmt (Kapitel 3.10.3). Die Zellen wurden gemäß Standardprotokoll behandelt (Kapitel 3.7).

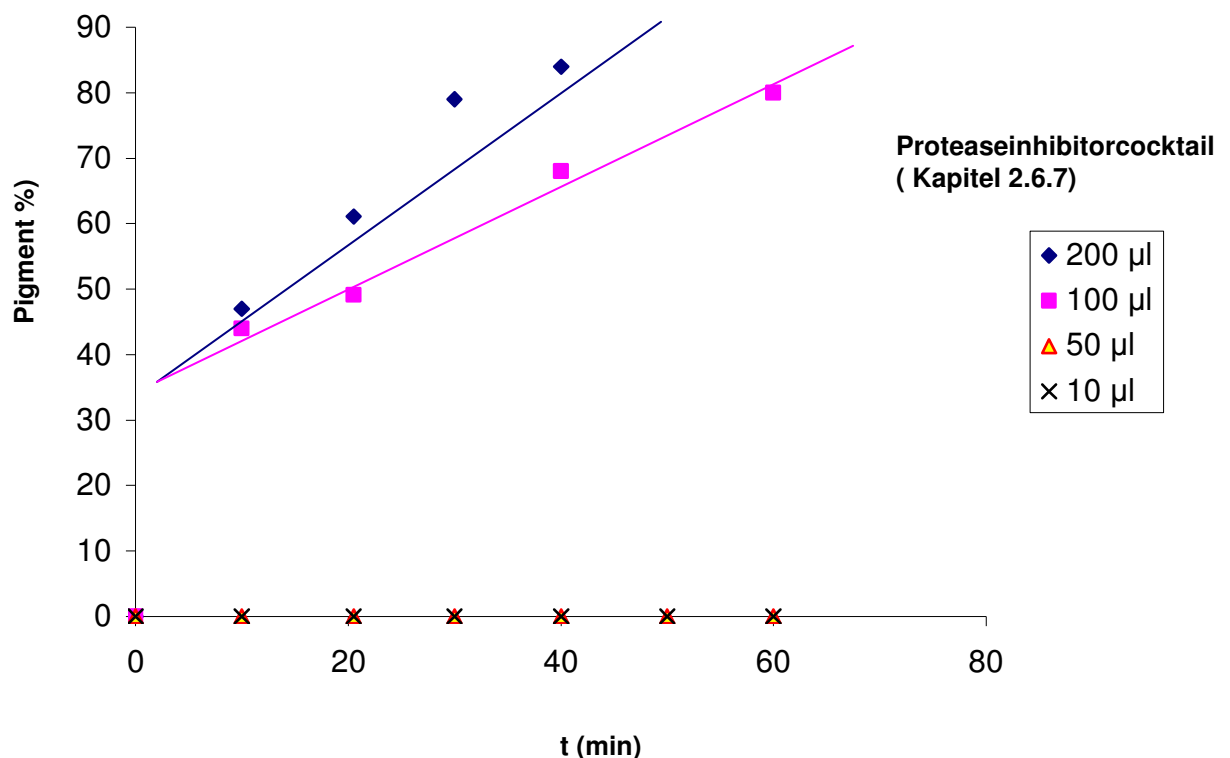


Abbildung 14: Farbstoffausfluß der Zellen (%) bei verschiedenen Konzentrationen von Proteaseninhibitoren in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (28 mM), Citrat (17mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM).

Abbildung 14 zeigt die Schädigung der Zellen durch verschiedene Konzentrationen an Proteaseinhibitoren. Sowohl beim Ausgangsvolumen von 200 μl als auch bei 100 μl Inhibitorcocktail ist nach etwa 20 min die Hälfte des Pigments bereits ausgelaufen, nach 40 min etwa 80 %. Erwartungsgemäß werden die Mikroplasmodien bei der Zugabe von 100 μl etwas weniger schnell geschädigt als bei 200 μl . Bei der Zugabe von 10 μl wie bei 50 μl konnte keine Schädigung im Meßzeitraum festgestellt werden. Für die folgenden Versuche wurde das optimale Volumen an Proteaseinhibitorcocktail auf 50 μl pro 5 ml Exportpuffer festgelegt.

4.3.3 Aktivität von Polymalatase im Überstand nach Zugabe von Proteaseinhibitorcocktail

Bei Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII wurde der Export von Polymalatase nach Zugabe von Proteaseinhibitoren bestimmt.

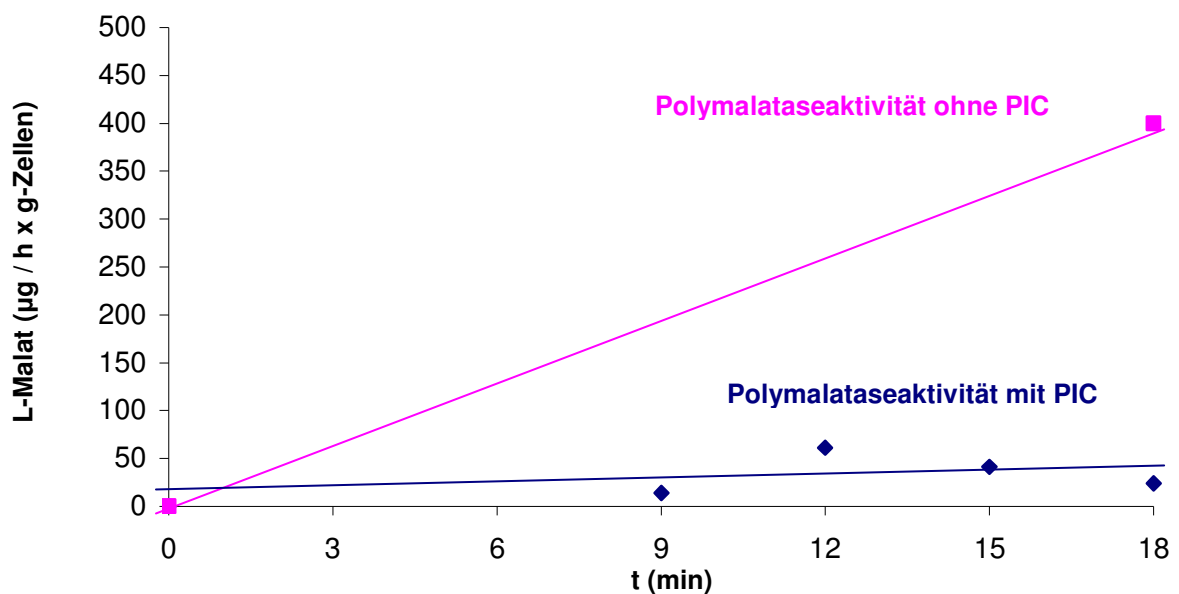


Abbildung 15: Abhängigkeit der Polymalatase-Aktivität im Überstand von der Zeit mit und ohne PIC. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM). Es wurden 50 μl 25 x Proteasehemmer zugegeben (Kapitel 2.6.7)

Die Zellen wurden wie im Abschnitt 3.7 und 3.8 beschrieben behandelt.

4.3.4 Export von Polymalat nach Zugabe von Proteaseinhibitoren

Abbildung 16 zeigt den Export von Polymalat in Gegenwart von Proteaseinhibitorcocktail (50 μ l).

Der Export ist mit 1200 μ g Malat/h x g Zellen nahezu identisch im Vergleich zum Export unter Standardbedingungen. Eine Hemmung wie bei der Polymalatase konnte nicht festgestellt werden.

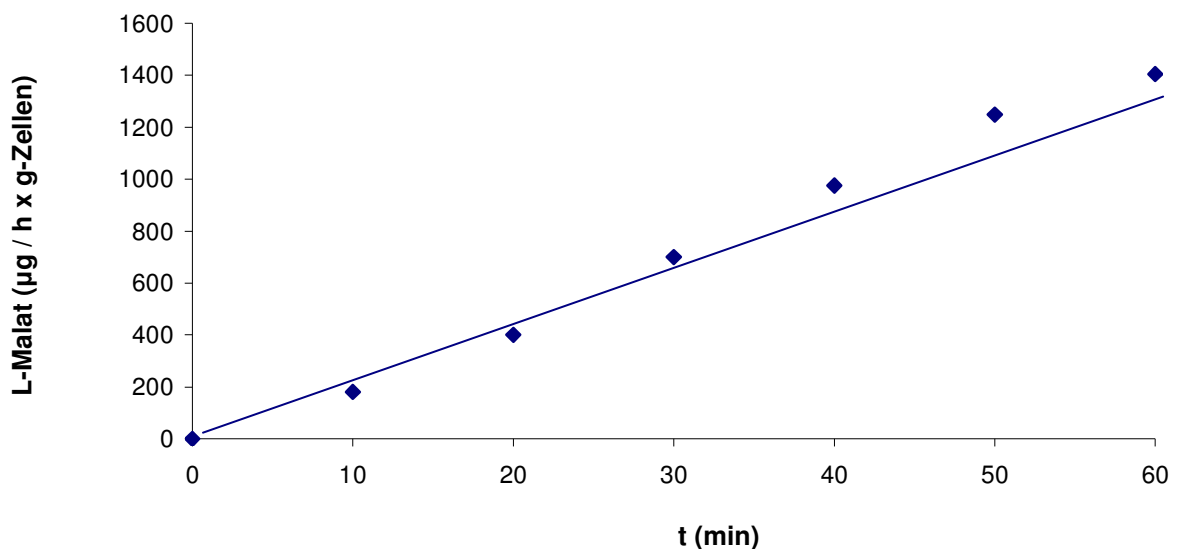


Abbildung 16: Polymalatexport in Gegenwart von Proteaseinhibitorcocktail. Es wurden Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM). Es wurden 50 μ l 25 x Proteasehemmer zugegeben (Kapitel 2.6.7).

4.4 Export bei Makroplasmodien

4.4.1 Entwicklung eines geeigneten Versuchssystems für den Export bei Makroplasmodien

Ziel der Entwicklung war es, ein geeignetes Instrumentarium für den Export bei Makroplasmodien zu finden. Dabei waren zwei Bedingungen zu beachten. Zum einen sollten die Makroplasmodien so angezogen werden, daß eine Injektion möglich war, und zum zweiten sollte eine Messung des Exports von Polymalat und Polymalatase durchführbar sein. Bei den Anzuchtbedingungen wurde eine frühere Arbeit als Grundlage (Richter, 2003) verwendet. Die Anleitung für die Exportversuche wurde neu entwickelt.

Das folgende Protokoll wird als Standardprotokoll für alle Exportversuche bei Makroplasmodien verwendet. Abweichungen werden an entsprechender Stelle angegeben. Die Versuchsanleitung wurde sowohl für den Stamm M₃CVII als auch für den Stamm LU 887 verwendet.

Makroplasmodien von *Physarum polycephalum* werden aus Schüttelkulturen (Kapitel 3.1.1.1) hergestellt. Dazu wird ein Aliquot einer 24 h alten Kultur geerntet und einmal mit gleichem Volumen Medium gewaschen. Aus diesem Aliquot werden 300 µl Suspension entnommen und in der Mitte einer behandelten Folie, die sich auf einer Agarplatte befindet, punktförmig aufgebracht und für 24 h bei 24 °C im Brutschrank inkubiert.

Bei der Folie (Kapitel 2.2) handelte es sich um eine handelsübliche Einmachfolie. Bei der Anzucht zeigte sich, daß sich die Folie innerhalb einer Stunde auf dem Agar zusammenzog und Falten bildete. Aufgrund dieser Faltenbildung wuchs *Physarum polycephalum* nicht mehr konzentrisch und bildete keine Adern mehr aus, die sich für die Injektion eigneten. Aus diesem Grund wurde die Folie 20 min vor Anzuchtbeginn in autoklaviertes H₂O bidest. gegeben. Dadurch wurde eine Faltenbildung der Folie auf dem Agar verhindert.

In die 24 Stunden alten Makroplasmodien wurden dann bei Bedarf die gewünschte Substanz, in der Regel Polymalat, mittels eines Injektors (Kapitel 2.2) in entsprechender Menge injiziert.

Für Exportversuche wurden die Makroplasmodien dann mit der Folie vom Agar in eine Petrischale mit Fliegengitter übertragen und mit 5 ml Exportpuffer (Kapitel 2.6.8) unterschichtet. Die Makroplasmodien wurden dann zur Standardisierung in den modifizierten Brutschrank gegeben (Beginn der Kinetik $t = 0$). Im Gegensatz zu Exportversuchen bei Mikroplasmodien mußte beim Schüttler der Kolbenhalteraufsatz entfernt werden, da sonst die Makroplasmodien geschädigt worden wäre. Ebenso wurde die Umdrehungszahl von 110 Upm auf 40 Upm erniedrigt. Versuche mit dieser Umdrehungszahl zeigten, daß diese für eine Durchmischung des Exportpuffers ausreichend war und die Makroplasmodien für mindestens 2 Stunden keine Schädigung durch Scherkräfte zeigten. Im Anschluß an die Exportversuche wurden die Größe und das Gewicht der Makroplasmodien bestimmt.

Damit war ein geeignetes Verfahren für die Anzucht, Injektion und Durchführung von Exportversuchen von Makroplasmodien etabliert.

4.4.2 Export von Polymalatase mit und ohne Injektion von Polymalat in Makroplasmodien von M₃CVII und LU 887

4.4.2.1 Zielsetzung

Die folgenden Versuche dienten zur Klärung, inwieweit die Injektion von Polymalat einen Einfluß auf den Export bzw. auf die Aktivität von Polymalatase im Exportpuffer hatte. Dazu wurde der Export von Polymalatase mit und ohne Injektion von Polymalat bestimmt. Die Injektionsmengen wurden so gewählt, daß sie mit dem intrinsischen Polymalatgehalt der Makroplasmodien vergleichbar waren. Des Weiteren wurde untersucht, ob der nur in geringen Mengen Polymalatase exportierende weiße Stamm LU 887 einen vergleichbaren Export vor und nach Injektion von Polymalat wie der gelbe Stamm M₃CVII aufwies.

4.4.2.2 Exportkinetiken für Plasmodien der Stämme M₃CVII und LU 887 ohne Injektion

Die Makroplasmodien wurden wie unter 4.4.2.1 beschrieben behandelt. Die nichtinjizierten Makroplasmodien wurden auf ein Fliegengitter transferiert und anschließend mit Exportpuffer unterschichtet. Die Naßgewichte der Makroplasmodien wurden in Tabelle 18 zusammengefaßt.

Stamm	M ₃ CVII	M ₃ CVII	M ₃ CVII	M ₃ CVII	LU 887	LU 887	LU 887	LU 887
Masse in mg	550	460	500	480	620	510	140	255

Tabelle 18: Naßgewichte der Makroplasmodien M₃CVII und LU 887 ohne Injektion

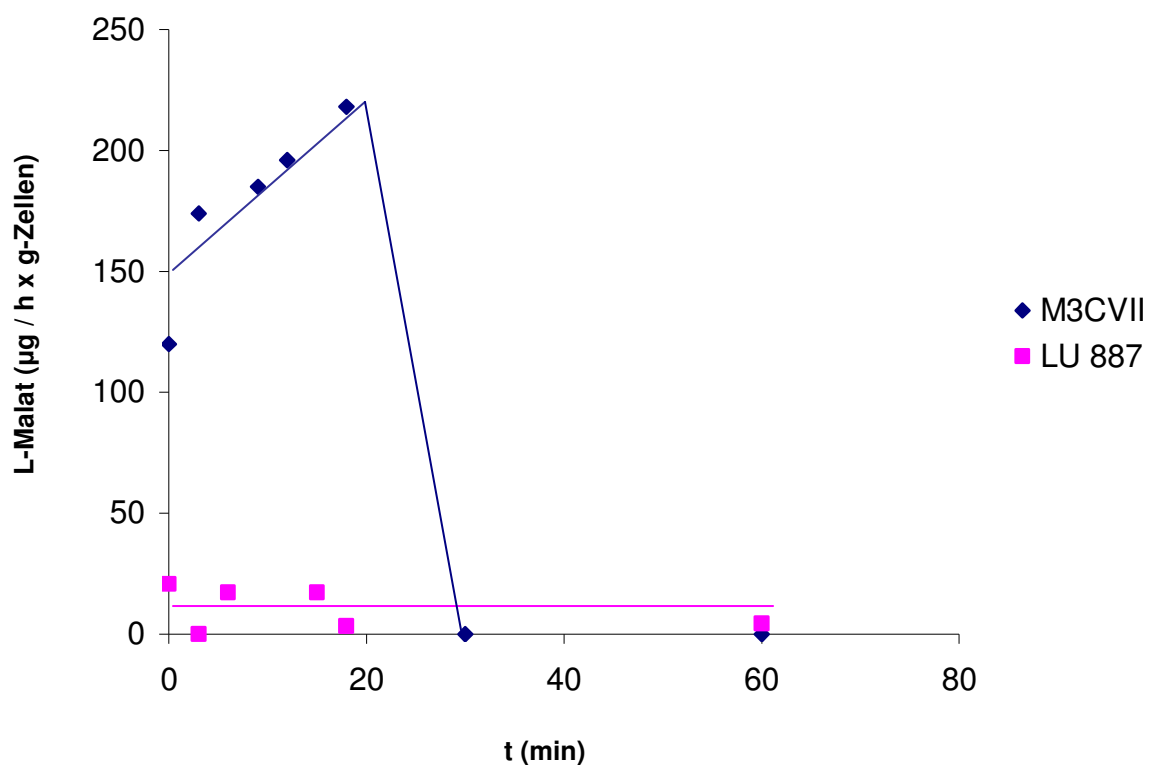


Abbildung 17: Abhängigkeit der Polymalataseaktivität ohne Injektion in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Makroplasmodien des Stammes M₃CVII und LU 887 unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM).

Die Aktivität der Polymalatase wurde wie im Kapitel 3.9.4 beschrieben gemessen. Die gemessene Menge Malat wurde gegen die Zeit der Probeentnahme aufgetragen (Abbildung 17).

Beim weißen Stamm LU 887 ist über 60 min keine Zunahme der Aktivität der Polymalatase festzustellen. Der gelbe Stamm M₃CVII zeigte ohne Injektion hingegen innerhalb der ersten 15 Minuten eine Aktivität von 240 Units/g h. Zwischen 18 und 30 min konnte keine Aktivität der Polymalatase mehr festgestellt werden. Dies stimmte mit Exportversuchen bei Mikroplasmodien überein, bei denen die Polymalataseaktivität nur über einen Zeitraum von 18 min verfolgt werden konnte (Brandmaier, 2003).

4.4.2.3 Exportkinetiken für Plasmodien der Stämme M₃CVII und LU 887 nach Injektion

Die Makroplasmodien wurden wie im Kapitel 3.1.1.3 angeimpft. Nach 24 h Inkubation wurden jeweils 400 µg Polymalat injiziert. Die injizierten Makroplasmodien wurden wie die nichtinjizierte Makroplasmodien ebenfalls auf ein Fliegengitter transferiert und anschließend mit Exportpuffer unterschichtet. Die Naßgewichte Makroplasmodien beider Stämme wurden in Tabelle 19 zusammengefaßt.

Stamm	M ₃ CVII	M ₃ CVII	M ₃ CVII	LU 887	LU 887	LU 887	LU 887
Masse in mg	341	304	137	199	105	150	144

Tabelle 19: Naßgewichte der Plasmodien M₃CVII und LU 887 mit Injektion von 400 µg Polymalat

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Exportaktivität für Polymalatase nach Injektion von Polymalat beim Stamm M₃CVII bzw. LU 887.

Die Aktivität der Polymalatase wird durch die Unterschiede der Geradensteigung für 90 und 0 min bestimmt. In Abbildung 15 werden die Werte bis 18 min benutzt. Bei längeren Zeiten wird eine Abflachung der Zeitabhängigkeit beobachtet.

Gelbe Makroplasmodien M_3CVII

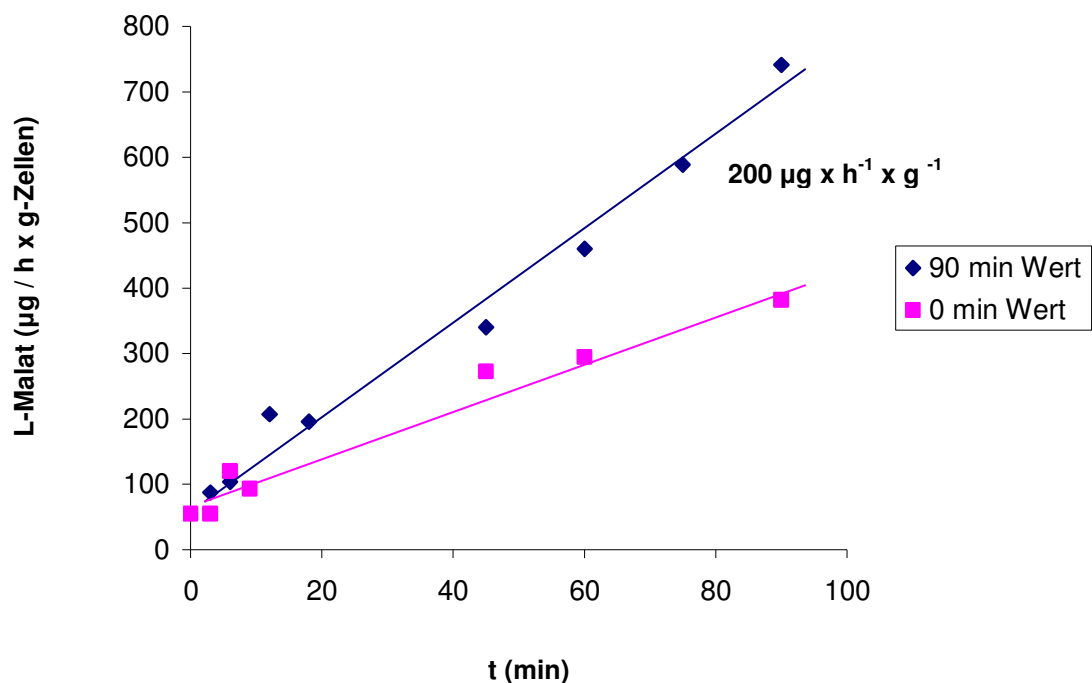


Abbildung 18: Abhängigkeit der Polymalataseaktivität mit Injektion von 400 µg Polymalat in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Makroplasmodien des Stammes M_3CVII unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM).

Die weißen Mutante LU 887 unterscheidet sich hinsichtlich des Polymalatexports als auch in der Exportgeschwindigkeit der Polymalatase.

Der gelbe Stamm M_3CVII zeigt nach Injektion von Polymalat eine Exportgeschwindigkeit von ca. 218 Units/g x h für Polymalataseaktivität. Im Vergleich dazu wies der weiße Stamm LU 887 160 Units/g x h. Somit wurde eine vergleichbare

Exportgeschwindigkeit für injizierte Makroplasmodien der Stämme M₃CVII und LU 887 festgestellt.

Weißer Makroplasmodien LU 887

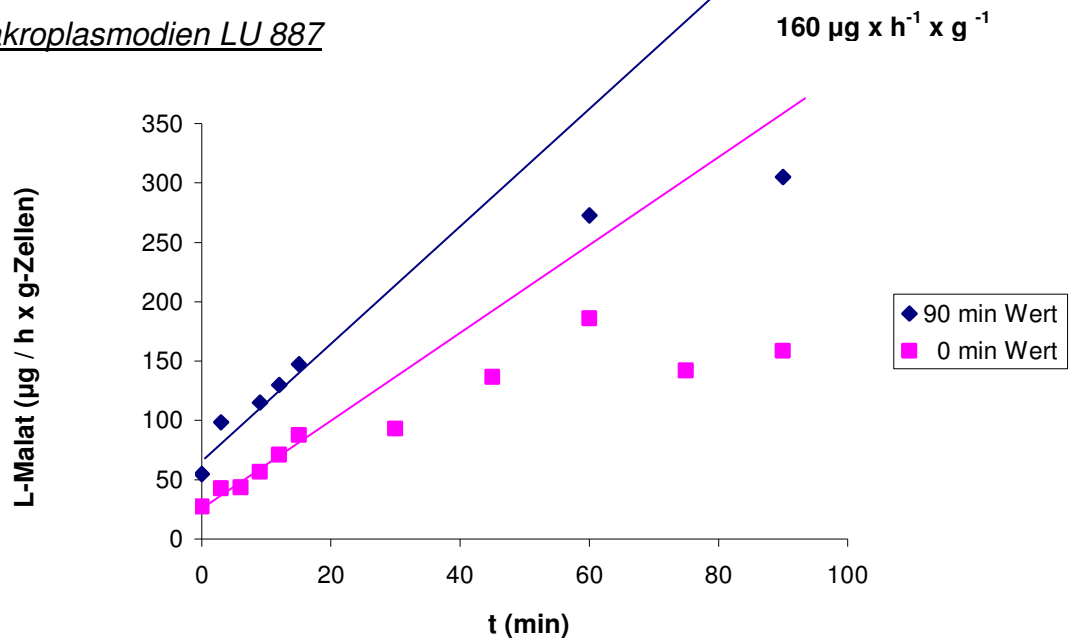


Abbildung 19: Abhängigkeit der Polymalataseaktivität mit Injektion von 400 µg Polymalat in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Makroplasmodien des Stammes LU 887 unter Standardbedingungen bei 24 °C, pH 4,3, 110 Upm, Zelldichte 0,4 g/ml und Grünlicht, verwendet. Der Puffer bestand aus MgCl (12,6 mM), Citrat (17 mM, pH 4,3) und Saccharose (215 mM). Nur die Anfangsgeschwindigkeiten werden ausgewertet.

Der gelbe Stamm besitzt vergleichbare Exportgeschwindigkeiten mit und ohne Injektion. Im Gegensatz dazu ist beim weißen Stamm ohne Injektion keine Aktivität festzustellen. Nach Injektion von Polymalat erreichten die weißen Makroplasmodien eine Exportgeschwindigkeit ähnlich wie die des gelben Stammes.

4.5 Aktivierung von Polymalatase durch MgATP in der Membranfraktion

Ein molekularer Regulationsmechanismus für die Aktivierung von Enzymen stellt die Proteinphosphorylierung dar (Karlson, 1994). In früheren Arbeiten wurden bereits Versuche zur Aktivierung von Polymalatase durchgeführt (Karl, 1999). Um diese Möglichkeit für die Aktivierung der Polymalatase zu prüfen, wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Kapitel 3.3.2.3) und die Fraktionen wurden mit dem alkalischen Phosphatase-Assay (Kapitel 3.3.2.3.3) auf das Vorhandensein von Cytoplasmamembranen hin untersucht. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität an Phosphatase wurde um den Faktor 3 mit Gradientenpuffer (Kapitel 3.3.2.3.3) verdünnt und mit 200 µl Proteaseinhibitor versetzt. Die Proben wurden zu je 2 ml aliquotiert und mit 5 mM Mg-ATP versetzt. Die Aktivierung wurde über einen Zeitraum von 60 min bei 20 °C verfolgt. 20 µl Proben wurden im Abstand von 10 min entnommen und ein Test auf Polymalatase-Aktivität (Kapitel 3.9.4) durchgeführt.

Abbildung 20 zeigt die Aktivität der Polymalatase nach Zugabe von Mg-ATP im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne MgATP.

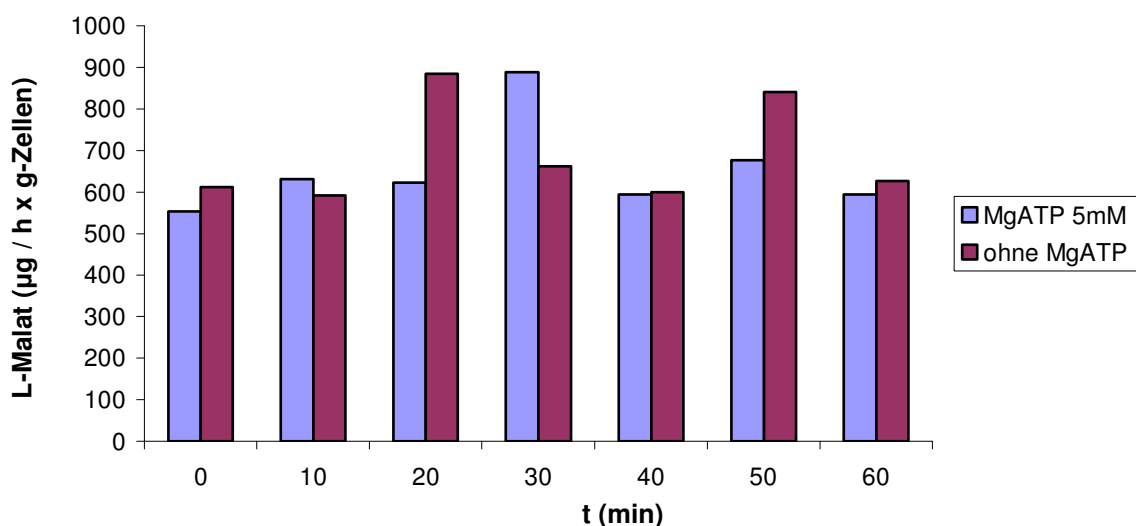


Abbildung 20: Abhängigkeit der Polymalataseaktivität in der Cytoplasmamembranfraktion in Gegenwart von Proteasehemmern (Kapitel 2.6.7) und in Gegenwart und Abhängigkeit von Mg-ATP (5 mM) in Abhängigkeit von der Zeit nach Dichtegradientenzentrifugation.

Die Werte schwanken stark, eine Aktivierung ist nicht feststellbar. Der Kontrollansatz zeigt mit Ausnahme des 30 und 40 min-Wertes immer eine höhere Aktivität als der Ansatz mit Mg-ATP. Wird die Gesamtaktivität mit und ohne Mg-ATP jeweils über die gesamte Meßzeit gemittelt, so ergibt sich mit $740 \pm 178 \mu\text{g/h g Zellen}$ mit Mg-ATP im Vergleich zu $749 \pm 121 \mu\text{g/h g Zellen}$ ohne Mg-ATP keine erkennbare Aktivierung der Polymalatase.

Die Beobachtung, daß eine Aktivierung der Polymalatase mit Mg-ATP nach Membranisolation durch Ultrazentrifugation nicht zu beobachten ist und auch die Messung sich problematisch erweist, deckt sich mit früheren Befunden (Ledl, 2001). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte die bei der Expression (Kapitel 4.9.5.3) gemachte Beobachtung sein, daß eine Aktivierung der rekombinant hergestellten Polymalatase mit Mg-ATP unter Ausschluß des Proteaseinhibitorcocktails (Kapitel 2.6.7) gelang. Bei allen Aktivierungsversuchen mit der Membranfraktion nach Ultrazentrifugation kam der Proteaseinhibitorcocktail zum Einsatz. Dies könnte die Schwierigkeiten sowohl bei der Aktivierung der Polymalatase mit Mg-ATP als auch bei der Durchführung der Messung der Aktivität erklären.

4.6 Herstellung eines Antikörpers für Polymalatase

4.6.1 Vorbemerkung

Der Nachweis der Polymalatase mittels Western-Blot-Analyse (Kapitel 3.6.3) der Mikroplasmodien von *Physarum polycephalum* nach Zellaufschluß und im Kulturmedium gestaltete sich in der Vergangenheit als schwierig. Die Spezifität dieser übrig gebliebenen Charge der Antikörper von Karl (Kapitel 2.3) war gegen die Polymalatase sehr gering. So fanden sich neben den erwarteten Banden bei 68 kDa im Außenmedium und den 97 kDa nach Zellaufschluß in der Membranfraktion (Kapitel 3.3.2.2) auch andere Banden mit unerwarteten Größen, etwa bei 45 kDa und 200 kDa. Daneben war die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen nicht gewährleistet, da bei gleichen Versuchen und Versuchsbedingungen jeweils verschieden große Banden immunologisch nachgewiesen wurden. Deshalb wurde mit Hilfe eines neuen

Antikörpers der Firma Pineda (Berlin) versucht, die Polymalatase immunologisch eindeutig nachzuweisen.

Die Antikörpergewinnung erfolgte in folgenden Arbeitsschritten:

1. Peptid-Auswahl
2. Synthese des Peptids
3. Kopplung eines Teils des Peptids an einen Proteincarriers
4. Immunisierung der Versuchstiere
5. Gewinnung der Antiseren
6. Affinitätsreinigung

4.6.2 Epitopanalyse

Vor der Herstellung des neuen polyklonalen Antikörpers durch die Firma Pineda (Berlin) wurde eine Epitopanalyse durchgeführt. Als Grundlage für diese Untersuchung wurde die Proteinsequenz von Reiter für Polymalatase (Reiter, 2003) gewählt. Die zur Antikörpergewinnung vorgeschlagenen Peptidsequenzen wurden mit allen Einträgen in Proteindatenbanken verglichen, um mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Proteinen zu überprüfen. Zusätzlich war für den erfolgreichen Einsatz des Polymalataseantikörpers neben der Lokalisierung der Peptidsequenz an der Proteinoberfläche eine möglichst große Bindungskraft (Avidität) erforderlich. Bei der Auswahl des Epitops gilt die Regel, daß das Immunisierungspeptid positiv und / oder negativ geladene Aminosäuren enthalten soll, um besonders immunogen und spezifisch zu sein. Von den verschiedenen vorgeschlagenen Peptidsequenzen wurde mit Hilfe der oben genannten Kriterien folgende Sequenz gewählt, wobei der C-terminal hinzugefügte Cysteinrest für die Kopplung des Peptids an die Proteincarrier bei der Immunisierung diene:

Sequenz: NH₂-CAGGEHPVYPEGKWR-CONH₂

Die Position des oben möglichen Epitops in der Aminosäuresequenz der Polymalatase lag bei 196 - 214 Aminosäuren.

4.6.3 Immunisierung

Nach Peptidsynthese und Kopplung an einen Proteincarrier KLH wurde die Immunisierung bei drei Kaninchen begonnen. Abbildung 21 zeigt die Zunahme der Spezifität des Antikörpers.

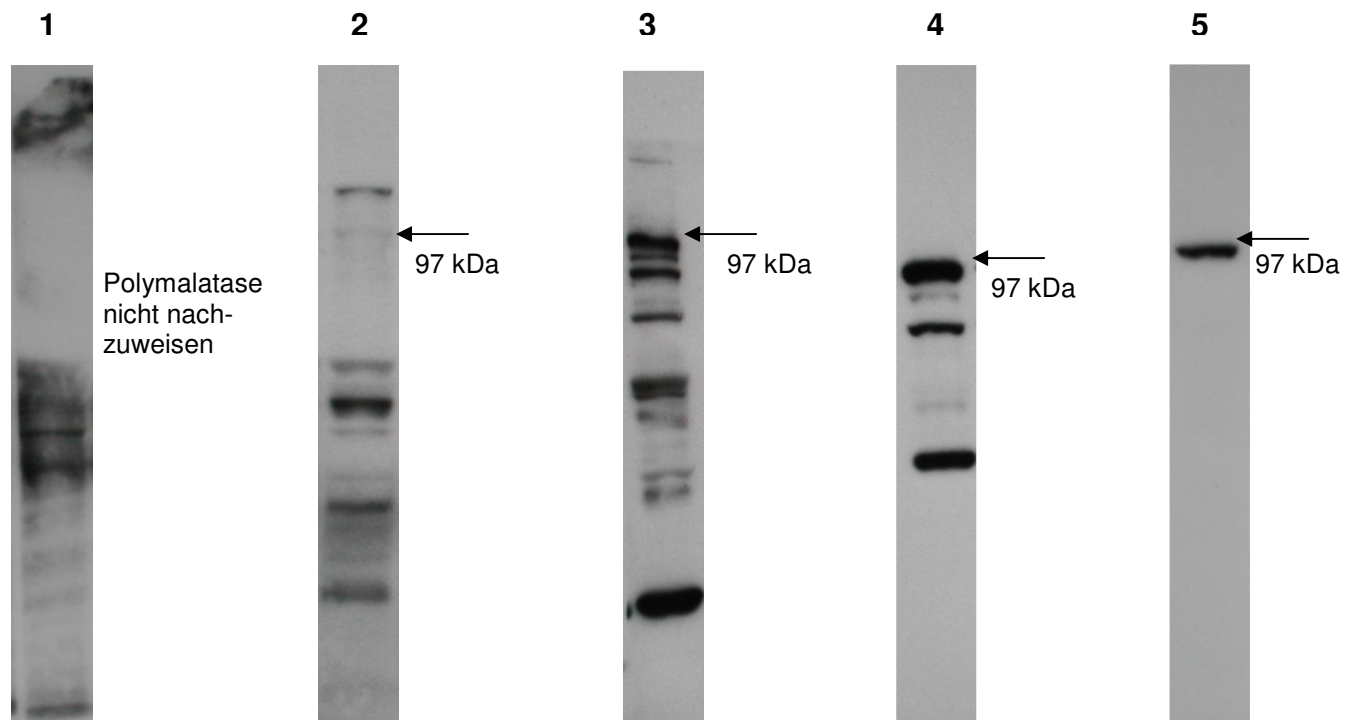


Abbildung. 21: Erhöhung der Spezifität des Antikörpers im Verlauf der Immunisierung. Proben von links nach rechts: **1** = Präimmunserum, **2** = 61. Immunisierungstag (IT), **3** = 90 IT, **4** = 135. Immunisierungstag, **5** = monospezifische IgG Fraktion aus Antiserum vom 135. Immunisierungstag. Alle Proben wurden in einer 1/10000 Verdünnung als 1. Antikörper im Western-Blot (Kapitel 3.6.4) verwendet. Es wurden 20 μ l von P2 (Cytoplasmamembran und andere Membranen) des fraktionierten Zellaufschlusses (Kapitel 3.3.2.2) bei der SDS-PAGE (Kapitel 3.6.2) verwendet. Der HMW – Proteinstandard wurde nicht aufgetragen (Kapitel 2.10.2), lediglich die 97 kDa Bande der Polymalatase wurde mit einem Pfeil markiert

Deutlich ist die Abnahme der Bandenzahl von den Präimmunseren über die verschiedenen Proben der Immunisierungstage bis zum gereinigten Antikörper, bei dem nur noch eine Bande bei 97 kDa zu sehen ist.

Der immunologische Nachweis erfolgte nach fraktioniertem Zellaufschluß (Kapitel 3.3.2.2) mit der Membranfraktion und SDS-PAGE.

4.7 Intrazellulärer und extrazellulärer Nachweis von Polymalatase

Mit Hilfe des neuen Antikörpers konnte jetzt versucht werden, Polymalatase in der Membran und im Cytoplasma von *Physarum polycephalum* nachzuweisen und deren Größe zu klären. Auch die Frage nach der Größe der Polymalatase im Überstand während des Wachstums sollte beantwortet werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die beobachtete Veränderung der Polymalatkonzentration im Kulturüberstand während des Wachstums mit einer Veränderung der Polymalatase in der Membran zusammenhing.

4.7.1 Polymalatase in der Membran

Mit 2 Tage alten Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII wurde ein fraktionierter Zellaufschluß (Kapitel 3.3.2.2) durchgeführt. Abbildung 22 zeigt die verschiedenen Fraktionen nach SDS-Page (Kapitel 3.6.2) und Western-Blot-Analyse (Kapitel 3.6.4) mit neuem Antikörper.

Die Polymalatase ist sowohl in der Membranfraktion P2 die Polymalatase als auch im Überstand Ü2 Cytoplasma nachzuweisen. In allen anderen Fraktionen fehlt diese. Die Größe wurde mit dem HMW-Standard von Sigma auf 97 kDa bestimmt.

Aus Abbildung 22 ist zu ersehen, daß die Polymalatase als eine stärkere Bande in der Cytoplasmamembran (P2) und als eine schwächere Bande in der Cytosolfraktion Ü2 mit dem neuen Antikörper nachgewiesen werden kann. Die intensivere Anfärbung von P2 im Gegensatz zu Ü2 läßt sich durch die höhere Konzentrierung des P 2 im Verlauf des fraktionierten Zellaufschlusses erklären (Kapitel 3.3.2.2).

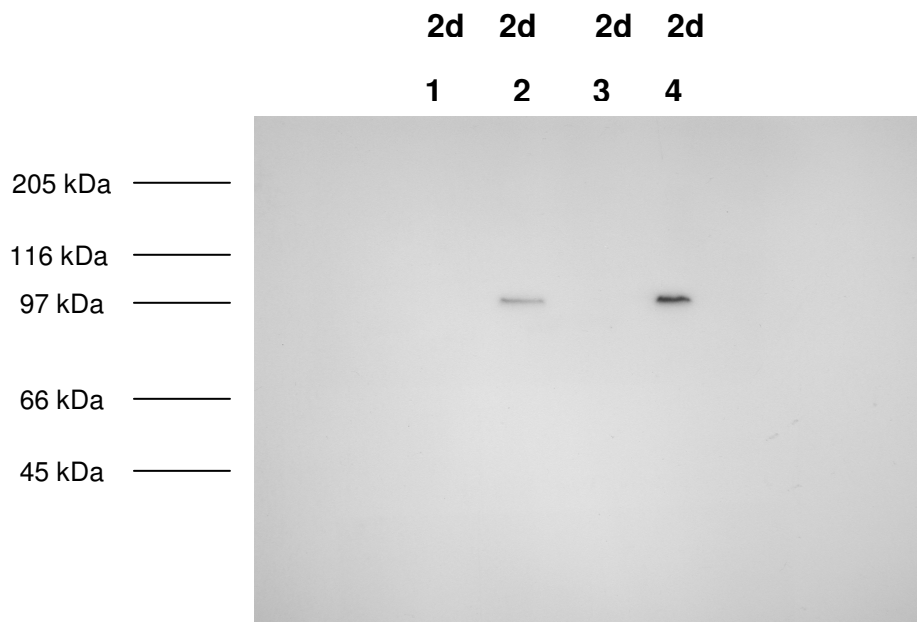


Abbildung 22: Fraktionierter Zellaufschluß von 2 Tage alte Mikroplasmodien des Stammes M_3CVII . **1** (Ü1) = Cytoplasma und Membranfraktion, **2** (Ü2) = Cytoplasma, **3** (P1) = Zellkerne und restliche ganze Zellen, **4** (P2) = Cytoplasmamembran und andere Membranen. Es wurden 20 µl aller Fraktionen in der SDS-Page (Kapitel 3.6.2) aufgetragen. Immunologische Detektion mit neuen Antikörper 1/10000 (Kapitel 4.6).

Es ist eine interessante Beobachtung, daß zwar in Ü2, nicht jedoch in Ü1 die Polymalatase angefärbt wird. Wenn die Polymalatase im Cytosol Ü2 vorliegt, dann müßte sie eigentlich in der Cytoplasma und Membranfraktion Ü1, die eine Vorstufe von Ü2 im fraktionierten Zellaufschluß darstellt, ebenfalls vorhanden sein. Eine Möglichkeit der Erklärung für diese Beobachtung ist, daß die Polymalatase mit zunehmender Dauer des fraktionierten Zellaufschlusses von der Membran abdissoziiert und ins Cytosol gelangt. Aus diesem Grund findet man Polymalatase in Ü2, nicht aber in Ü1.

Die intrazelluläre Größe der Polymalatase betrug 97 kDa. Dieser Sachverhalt wurde erst mit dem Einsatz des neuen Antikörpers ersichtlich, da mit den alten Antikörpern sowohl in den Fraktionen Ü1 und P1 als auch in Ü2 und P2 mehrere Banden angefärbt wurden und so eine eindeutige Aussage zum Nachweis der Polymalatase in den verschiedenen Fraktionen nicht möglich war.

4.7.2 Polymalatase im Kulturüberstand

In Kapitel 4.7.1 wurden die Größe und das Vorkommen der Polymalatase in der Membran und im Cytoplasma nachgewiesen. Die Proben wurden aus dem Kulturüberstand während des Wachstums aus 5 Tage alten Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII gewonnen und nach SDS PAGE (Kapitel 3.6.2) die Polymalatase immunologisch mit dem neuen Antikörper nachgewiesen (Kapitel 2.3).

Aus Abbildung 23 ist zu erkennen, daß sich eine Bande bei 68 kDa findet.

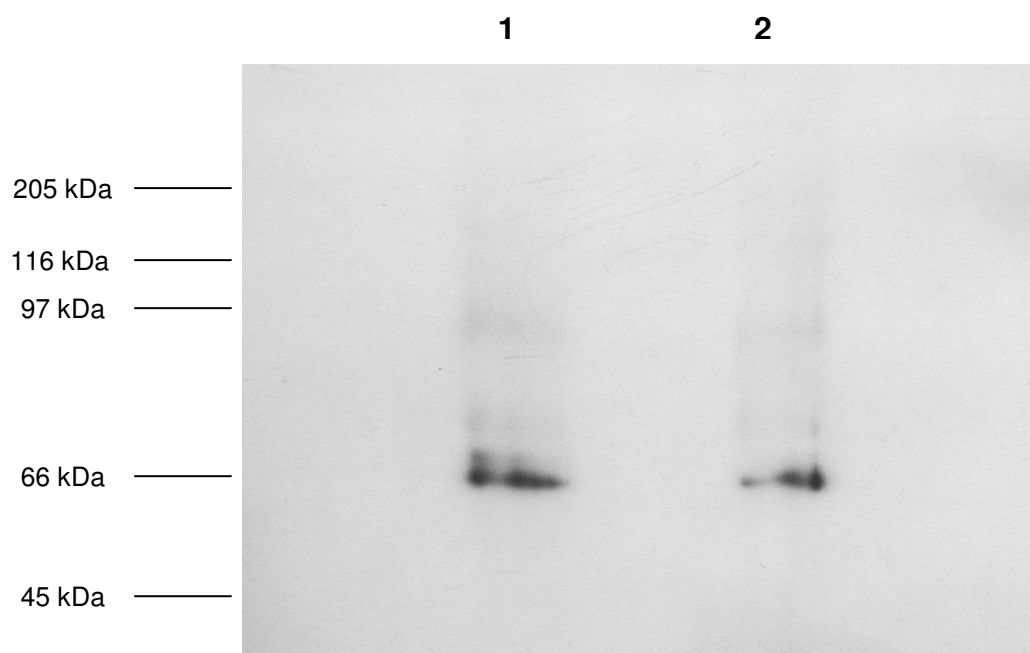


Abbildung 23: 1 u. 2 = Proben aus dem Kulturüberstand von 5 Tage alte Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII. Es wurden 30 µl aller Fraktionen in der SDS-Page (Kapitel 3.6.2) aufgetragen. Immunologische Detektion mit neuen Antikörper 1/10000 (Kapitel 4.6).

4.7.3 Polymalatase in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

In früheren Arbeiten (Ledl, 2001) konnte gezeigt werden daß mit zunehmender Kultivierungsdauer die Polymalatmenge im Kulturüberstand abnahm und die Polymalataseaktivität im Kulturüberstand zunahm, wobei sich die Proteinmenge nach

Zellaufschluß in den Mikroplasmodien verringerte. Aus Abbildung 24 ist der Unterschied zwischen 2 und 8 Tage alten Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII nach fraktioniertem Zellaufschluß zu sehen. Die Polymalatase mit einem Molekulargewicht von ungefähr 97 kDa findet sich nur in der Cytoplasmafraktion und in der Membranfraktion von 2 Tage alten Mikroplasmodien. In 8 Tage alten Mikroplasmodien konnte Polymalatase nicht mehr nachgewiesen werden.



Abbildung 24: Vergleich zwischen 2 Tage alten und 8 Tage alten Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII nach fraktioniertem Zellaufschluß. **1** (Ü1) = Cytoplasma und Membranfraktion, **2** (Ü2) = Cytoplasma, **3** (P1) = Zellkerne und restliche ganze Zellen, **4** (P2) = Cytoplasmamembran und andere Membranen. Es wurden 20 µl aller Fraktionen in der SDS-Page (Kapitel 3.6.2) aufgetragen. Immunologische Detektion mit neuen Antikörper 1/10000 (Kapitel 4.6). Die Nummerierung des Western-Blot erfolgte wie in Abschnitt 4.7.1

Erläuterungen zu dem Vorkommen der Polymalatase in P2 und Ü2 siehe Kapitel 4.7.1.

4.8 Klonierung des Polymalatase-Gens

4.8.1 Vorbemerkung

Nach endgültiger Aufklärung der Sequenz der Polymalatase konnte eine Expression des Enzyms versucht werden. Dazu sollte zuerst das Gen nach Isolierung der Gesamt-RNA und Transkription in cDNA und PCR mit verschiedenen Primern stabil in den pUC 19 Vektor kloniert werden. Die unternommenen Versuche unter variierenden Bedingungen sind in Kapitel 4.8.2.1 näher erläutert.

4.8.2 Isolierung des Polymalatase-Gens aus *Physarum polycephalum* und Klonierung in pUC 19-Vektor

Die Isolierung des Polymalatasegens aus *Physarum polycephalum* wurde wie in Kapitel 3.4 beschrieben durchgeführt. Nach Lyophilisierung der Physarumzellen und Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNA easy kit von Quiagen wurde die Gesamt-RNA in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase umgeschrieben. Mittels PCR (Kapitel 3.5.8) wurde dann mit verschiedenen Primern, die in Kapitel 4.8.2 näher beschrieben sind, und cDNA als Matrize verschieden lange Fragmente des Polymalatasegens hergestellt. Mit diesen Fragmenten wurde dann eine Klonierung in den pUC 19-Vektoren versucht.

4.8.2.1 Klonierungsversuch mit verschiedenen Primern in pUC 19-Vektor

Das erste Primerpaar für die Herstellung eines Polymalatasefragments war das Primerpaar PLMA SPFY1 und PLMA RV YE1. Mittels PCR und der Pfu-Polymerase war es möglich, dieses Fragment 1 zu amplifizieren. Die Primer waren nicht phosphoryliert. Dadurch war nach der Öffnung des pUC 19-Vektors mit Sma I, einem Enzym das nach dem Restriktionsverdau glatte Enden an der Schnittstelle hinterläßt, eine Ligation (Kapitel 3.5.7) möglich. Es stellte sich aber heraus, daß das

Polymalatasefragment 1 sich trotz mehrmaliger Versuche mit dem Stamm DH10 B nicht in den pUC 19-Vektor klonieren lies. Es fanden sich nur Kolonien, die den Vektor ohne Insert besaßen. Auch das mit den Primern PMLA FY 1 und PMLA RV YE1 hergestellte Fragment 2 lies sich zwar mit Hilfe der PCR vervielfältigen, aber es fanden sich wiederum keine Klone mit Insert im Stamm DH 10 B, obwohl nach erfolgter Ligation mit Sma I 1 h nachverdaut wurde. Versuche mit den *E. coli* Stämmen Jm 109 und DH 5 α zeigten das gleiche Ergebnis. Einige oben genannte Ansätze wurden auch mit phosphorylierten Primern und dephosphorylierten (Kapitel 2.9) pUC 19-Vektor durchgeführt. Dadurch sollte der Ringschluß des Vektors verhindert werden und eine Aufnahme des Inserts in den Vektor ermöglichen. Bei all diesen Ansätzen ergaben sich nur Klone ohne Insert.

4.8.2.2 Weitere Klonierungsversuche im pUC 19- und Hefeexpressions-Vektor pAM 81

Da eine Klonierung der Fragmente 1 und 2 in pUC 19 in den verschiedenen *E. coli* Stämmen nicht erfolgreich war, wurde versucht, dieses Fragment in den Hefeexpressionsvektor pAM 81 zu klonieren. Dazu wurden 2 μ g des Hefeexpressionsvektor mit Sal I $\overline{\text{N}}$ linearisiert. Der Vektor wurde mit Hilfe der T4 Polymerase mit glatten Enden versehen. Der Vektor wurden dann mit dem Enzym Shrimp alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Der Vektor plus Insert sollte zuerst in einen *E. coli* Stamm transformiert werden, um anschließend dann eine Transformation mit dem Hefestamm AH22 durchgeführt werden. Aber auch hier war schon eine Transformation des Hefeexpressionsvektors in die *E. coli*-Stämme DH 10 B, JM 109 und DH 5 α nicht erfolgreich.

Nach den oben genannten Versuchen des Einbaus bei den Fragmenten 1 und 2 sowohl in pUC 19-Vektor als auch in den Hefeexpressionsvektor pAM 81 wurde versucht kleinere Fragmente der Polymalatase in den pUC 19-Vektor zu klonieren. Dazu wurde mit Hilfe der PCR und den Primern PLMA SPFY1 und RV 3 ein Fragment 3 amplifiziert. Dieses Fragment 3 wurde in den pUC-19 Vektor kloniert und in den *E.*

coli-Stamm DH 10 B transformiert. In diesem Fall wurden Klone mit Insert in der richtigen Größe gefunden.

Da für eine erfolgreiche Expression das Stop-Codon notwendig war, wurde ein Klonierungsversuch mit einem längeren Fragment 4 versucht. Die Klonierung wurde wie bei Fragment 3 durchgeführt. Als Änderung wurde die Primer PMLA FE Y1 und RV 11 verwendet. Das Fragment 4 wurde mit der PCR vervielfältigt und in den Stamm DH 10 B transformiert. Die Plasmide wurden mit durch Miniprep-Methode isoliert. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis nach erfolgten analytischen Verdau mit Sac I. Zu sehen sind das Fragment von 1700 kb mit dem Vektor pUC 19 bei 2,9 kB. Die Plasmide mit den Inserts wurden mit den Primern PMLA F 9 und PLMA RV 6 sequenziert. Die Sequenzierung ergab, daß das Plasmid das Fragment 4 enthielt.

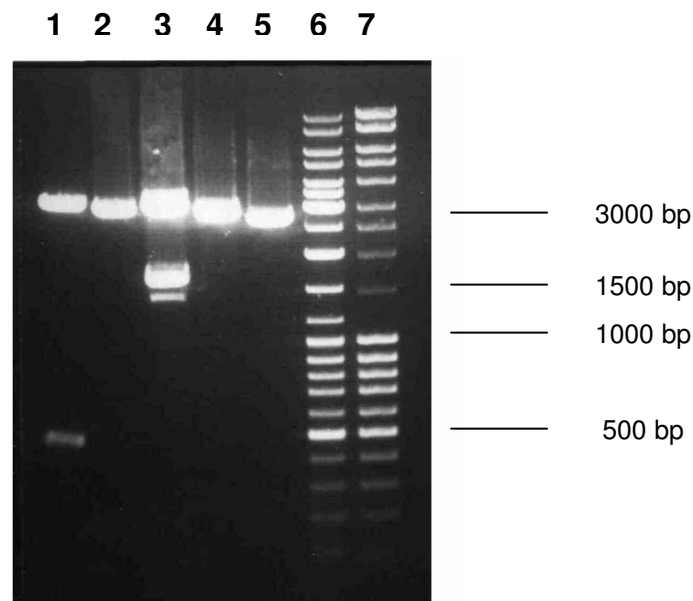


Abbildung 25: Vektor pUC 19 und Insert nach analytischem Verdau mit SacI und Agarosegelelektrophorese. Auftrag: **1 - 5** = 20 µl und 3 µl 6x Loading Dye, **6 u. 7** = 5 µl Standard (Kapitel 2.10.1), **1, 2, 3, 4, 5** = Vektoren ohne oder mit inkorrekten Insert, **4** = Vektor pUC 19 (2,9 kB) mit Insert (1,7 kB) in der richtigen Größe.

4.9 Expression des Polymalatase-Gens in pET 24 a (+) Vektor

4.9.1 Vorbemerkung

Mit Hilfe eines *E. coli*-Vektors pET 24 a (+) von Novagen sollte das Polymalatase-Gen exprimiert werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus *Physarum polycephalum* isoliert und in cDNA mittels der Reversen Transkriptase umgeschrieben (Kapitel 3.4.1). Mit Hilfe des PCR Verfahrens und der Primer PMLA-Nhe I und PMLA-Not I wurde das Polymalatase-Gen vervielfältigt, anschließend in den pUC 19-Vektor und danach in den pET 24 a (+) Vektor kloniert.

4.9.2 Klonierung mit dem Primerpaar PMLA-Nhe I und PMLA-Not I in pUC 19 Vektor

Nach der erfolgreicher Klonierung des Fragments 4 (Kapitel 4.8.2.2) in pUC 19 Vektor konnte versucht werden, das Polymalatase-Gen zuerst in Vektor pUC 19 und anschließend in den pET-Vektor zu klonieren. Dazu wurde mit dem Primerpaar PMLA-Nhe I und PMLA-Not I PCR das Polymalatase-Gen wie in Kapitel 4.8.2.1 amplifiziert (Fragment 5, Anhang). Der Vektor pUC 19 wurde mit Sma I $\overline{\text{N}}$ verdaut. Das amplifizierte Polymalatase-Gen wurde mittel einer Ligation $\overline{\text{N}}$ bei 18 °C mit glatten Enden (Kapitel 3.5.7.1) in den pUC 19 Vektor eingebracht.

Um zu überprüfen, ob der Vektor das Insert in der richtigen Größe besaß, wurde der Ligationsansatz in *E. coli* DH 5 α transformiert (Kapitel 3.2) und auf LB amp Platten ausgestrichen. 12 Kolonien wurden $\overline{\text{N}}$ bei 37 °C in 5 ml LB amp Medium angezogen und die zu untersuchenden Vektoren mittels der Miniprep-Plasmidisolation (Kapitel 3.5.1) gewonnen. Abbildung 26 zeigt die Vektoren nach analytischen Verdau mit Eco RI (Kapitel 3.5.1) und nach Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.5.4).

Der Vektor pUC 19 hat eine Größe von 2,9 kB und das Polymalatase-Gen eine Größe von 2,1 kB. Das ergibt eine Größe von Vektor und Insert von ca. 5 kB. Nur Miniprep 4 zeigt in Abbildung 22 die richtige Größe.

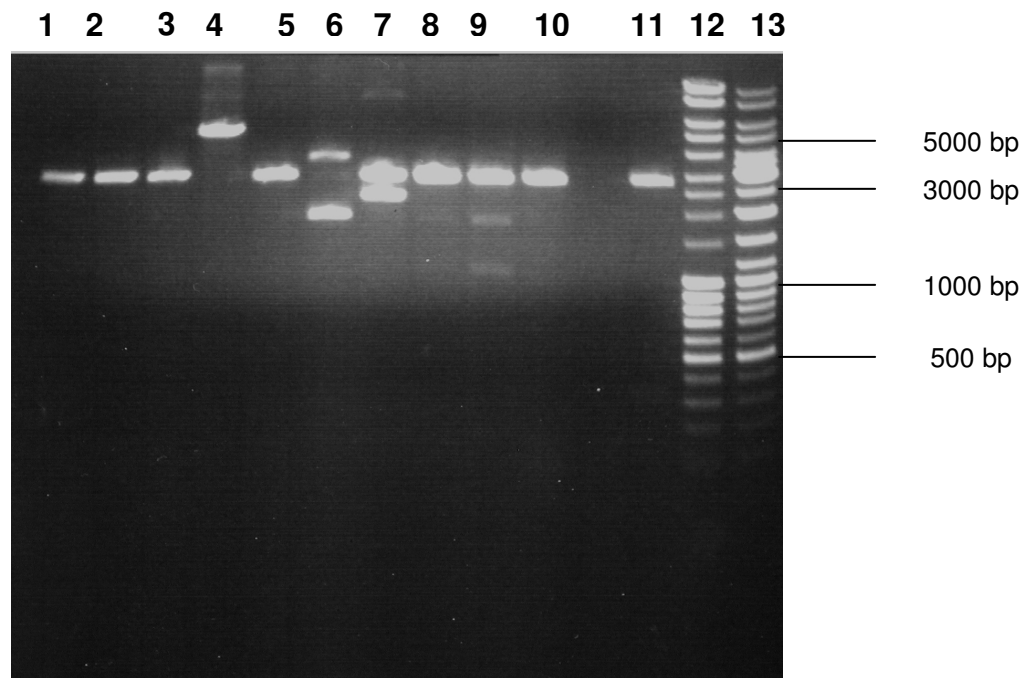


Abbildung 26: pUC 19 mit und ohne Insert nach analytischem Verdau mit Eco RI und Agarose-Gelelektrophorese (1%). Auftrag: **1 - 11** 20 μ l und 3 μ l 6 x Loading Dye, **12** u. **13** = 5 μ l Standard (Kapitel 2.10.1), **1 - 3** und **5 - 11** = Vektoren ohne oder mit inkorrekten Insert, **4** = Vektor pUC 19 (2,9 kB) mit Insert (2,1 kB) in der richtigen Größe.

Nach der Konzentrationsbestimmung des Miniprep 4 (Kapitel 3.5.3) wurde 1 μ g DNA in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß im Speed vac für 10 min getrocknet. Die Sequenzierung der Probe ergab das Vorhandensein des Polymalataase-Gens (Fragment 5) in pUC 19 Vektor (MWG-Biotech).

4.9.3 Klonierung des Polymalatasegens in pET 24 a (+) Vektor

Nach erfolgreicher Klonierung des Polymalatase-Gens in pUC 19 Vektor sollte jetzt das Polymalatase-Gen in den pET-Expressionsvektor umkloniert werden.

Dazu wurden 10 µl des Miniprep 4 in 50 µl Gesamtvolumen mit Nhe I in 1 X Pufferkonzentration nach Angaben des Herstellers für 4 h verdaut. Die vollständige Linearisierung des Vektors wurde mit einer Agarosegelelektrophorese (1 %) überprüft. Dann wurde die Pufferkonzentration auf 2 X erhöht und mit Not I wieder für 4 h im gleichen Puffersystem verdaut. Der Ansatz wurde bei 65 °C für 20 min deaktiviert. Der pET 24 a (+) Vektor wurde analog MP 4 mit NheI und Not I verdaut.

Da sowohl der Expressionsvektor pET 24 a (+) als auch das Polymalatase-Gen über jeweils eine Schnittstelle Nhe I und Not I verfügen, konnte das Polymalatase-Gen im richtigen Leserahmen in den Vektor eingebracht werden.

Dazu wurde die Konzentration von Vektor und Insert bestimmt (Kapitel 3.5.3) und anschließend eine Ligation mit überhängenden Enden (Kapitel 3.5.7.2) durchgeführt.

Nach der Ligation wurde der Ansatz in *E. coli* DH 5 α transformiert und auf LB kan Platten ausplattiert. Nach Inkubation ÜN bei 37 °C wurde mit 12 Kolonien 5 ml LB kan Medium angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert.

Die Plasmide wurden im Anschluß mit der Miniprep-Plasmidisolation gewonnen. Nach erfolgter Isolation wurden die Miniprep mit EcoRI analytisch verdaut (Kapitel 3.5.5) und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Abbildung 27. zeigt die Miniprep 1 - 12 nach Agarosegelelektrophorese. Der pET 24 a (+) Vektor hat eine Größe von 5,3 kB, das Insert mit Nhe I und Not I verdaut etwa 2,1 kB. Die Plasmide in Spur 1, 5 und 6 zeigen die Vektoren und Plasmide in der richtigen Größe.

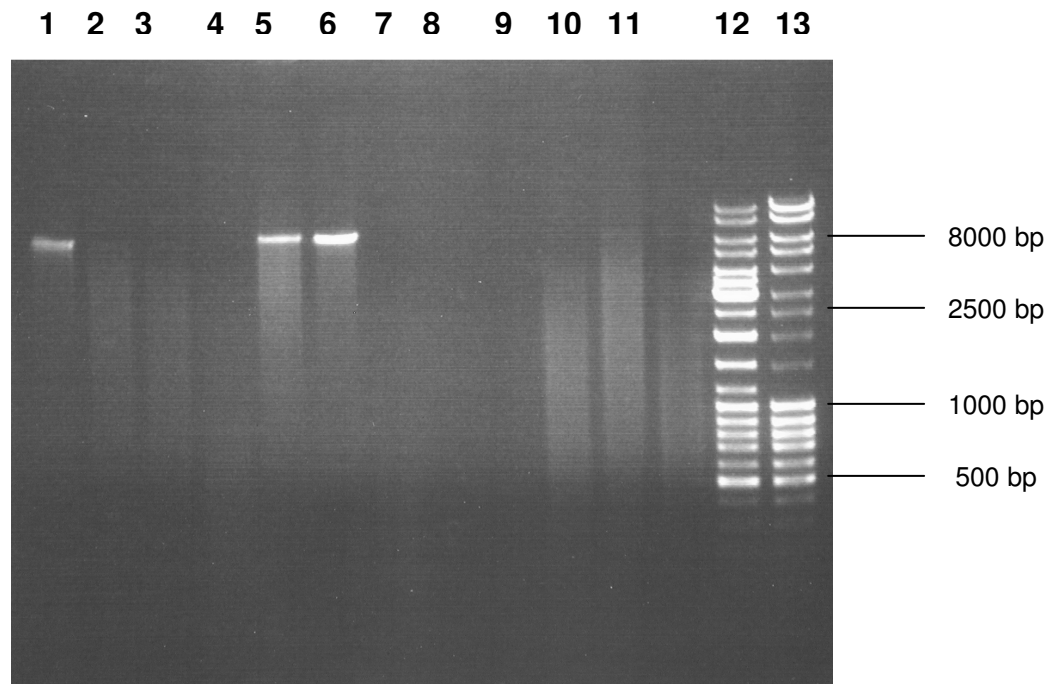


Abbildung 27: pET-Vektor 24 a (+) und Polymalalataseinsert Nhe I und Not I nach analytischem Verdau mit EcoRI und Agarosegelelektrophorese. Auftrag: 1 - 11 = 20 μ l und 3 μ l 6 x Loading Dye, 12 und 13 = 5 μ l Standard (Kapitel 2.10.1). 2 - 4 und 7 - 11 = Vektoren ohne Insert. 1, 5 und 6 = Vektor pET -Vektor 24 a (+) (5,3 kB) mit Insert (2,1 kB) in der richtigen Größe.

Zur Überprüfung, ob der Vektor das richtige Insert besaß wurde mit den Primern PMLA F3 und PLMA RV 11 eine PCR durchgeführt (Kapitel 3.5.8). Abbildung 24 zeigt in Spur 1 das Fragment in der richtigen Größe. Das Fragment wurde mit dem PCR Purifikation Kit (Quiagen) wie vom Hersteller beschrieben gereinigt und mit autoklaviertem H₂O bidest. eluiert.

Nach der Konzentrationsbestimmung des Fragments (Kapitel 3.5.3) wurde 1 μ g DNA in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß im Speed vac für 10 min getrocknet. Die Probe wurde dann mit den Primern PLMA F3 und PLMA RV3 (10 pmol/ μ l) sequenziert (MWG-Biotech).

Die Sequenzierung bestätigte das Vorhandensein des Polymalatase-Gens (Fragment 5) im Expressionsvektor pET 24 a (+).

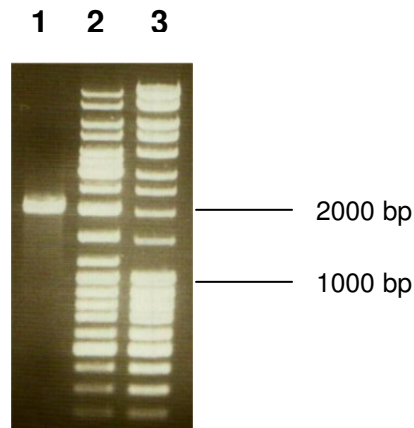


Abbildung 28: 1 = PCR des Vektors pET 24 a (+) und Inserts mit den Primern PMLA F3 und PMLA RV11. Auftrag: 1 = 20 µl und 3 µl 6x Loading Dye, 2 u. 3 = 5 µl Standard (Kapitel 2.10.1).

4.9.4 Expression von Polymalatase (Fragment 5) im analytischen Maßstab mit anhängenden Histidin-Resten

4.9.4.1 Produktion von Polymalatase (Fragment 5) mit und ohne IPTG

Durch die Klonierung des Polymalatase-Gens (Fragment 5) in den *E. coli* - Expressionsvektor pET 24 a (+) konnte die Expression des Polymalatase-Gens (Fragment 5) versucht werden. Mit Hilfe der anhängenden Histidin-Rest war ein Nachweis über Western-Blot möglich.

Mit dem Vektor pET 24 a (+) plus Polymalatase (Fragment 5) wurde *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (Kapitel 3.2.2). Die Probeexpression bei 37 °C (Kapitel 3.6.1) wurde mit und ohne Induktion mit IPTG durchgeführt. Abbildung 25 zeigt den Nachweis des exprimierten Proteins nach Zellaufschluß und SDS-PAGE. Die immunologische Detektion wurde mit dem Antikörper p97 neu durchgeführt. Aus

Abbildung 29 ist zu ersehen, daß für die Produktion die Induktion mit 1mM IPTG notwendig war. Das exprimierte Protein fand sich zu einem Großteil im Pellet und zu einem geringen Prozentsatz im löslichen Überstand. Das exprimierte Protein im hatte bei der SDS-Page eine Molekularmasse von 66 000.

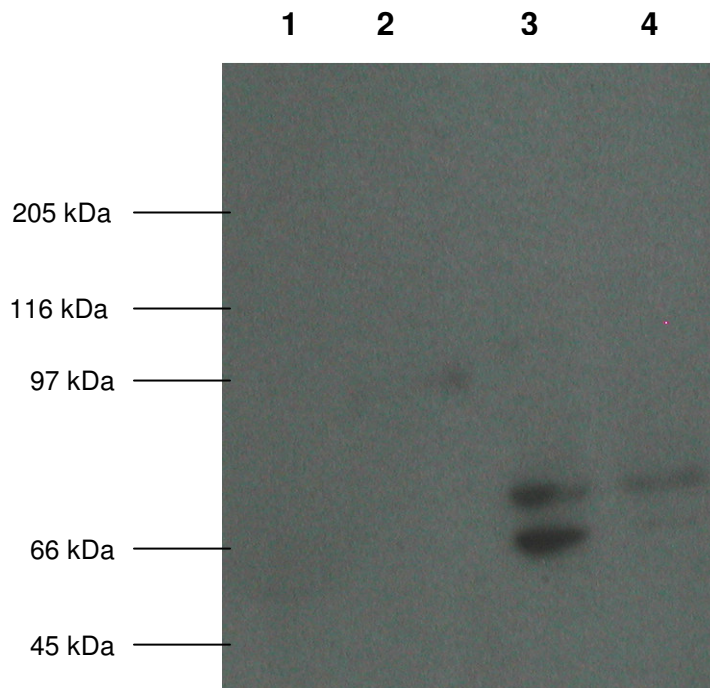


Abbildung 29: Expression des Polymalatase-Gens (Fragment 5) in *E. coli* 21 (DE3) nach Zellaufschluß, SDS-Page und Western-Blot mit und ohne Induktion mit 1mM IPTG. **1** = Pellet ohne IPTG, **2** = Überstand ohne IPTG, **3** = Pellet mit IPTG, **4** = Überstand mit IPTG.

4.9.4.2 Isolierung von Polymalatase in Gegenwart von Proteaseinhibitorcocktail

Das Protein zeigte nach SDS Page eine Molekularmasse von 66 kDa, während die aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekularmasse 78 000 Da betrug (Reiter, 2003). Als Erklärung der Diskrepanz erschien ein teilweiser Abbau des rekombinanten Proteins durch Proteasen als möglich. Aus diesem Grund wurde das Polymalatase-

Gen (Fragment 5) erneut exprimiert, der Zellaufschluß aber unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (Complete-Tabletten) (Kapitel 2.6) durchgeführt.

Die Complete-Tabletten enthalten einen Protease-Inhibitormix und EDTA, wodurch die häufigsten tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Proteasen inhibiert werden. Abbildung 30 zeigt die Isolierung der Polymalatase in Gegenwart und Abwesenheit von Proteaseinhibitorcocktail. Die Größe des exprimierten Proteins blieb nach Zugabe unverändert bei 66 000 Da. Damit konnte eine proteolytische Abspaltung von Teilen der Polymalatase ausgeschlossen werden.

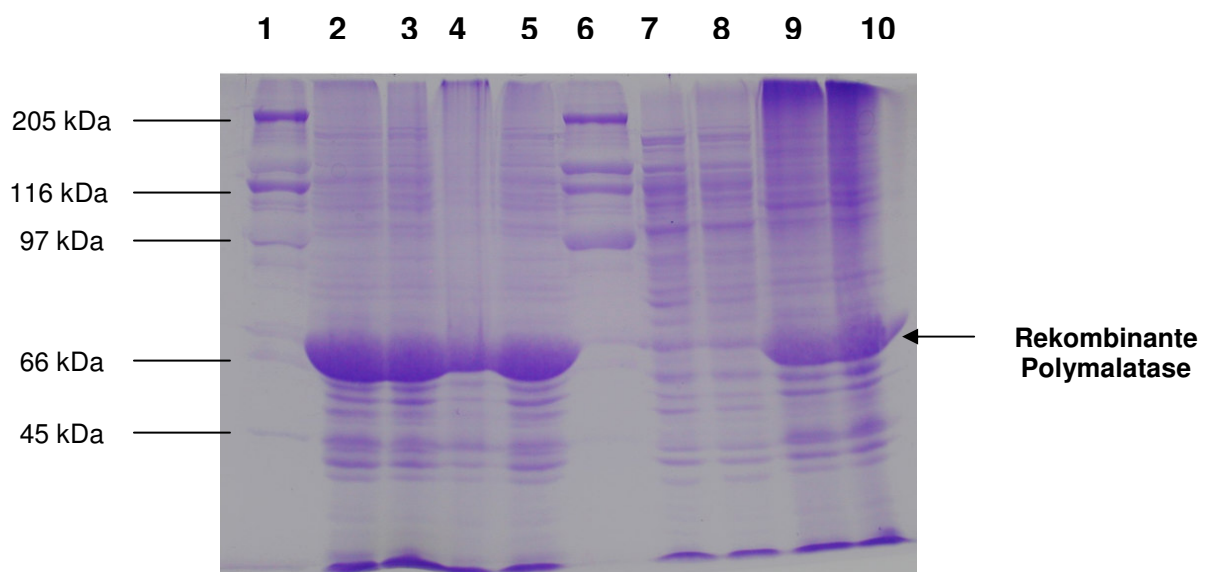


Abbildung 30: Expression des Polymalatase-Gens (Fragment 5) in *E. coli* 21 (DE3) nach Zellaufschluß, SDS-Page und Coomassiefärbung in Gegenwart und Abwesenheit von Proteaseinhibitorcocktail. Es wurden von allen Pellets und Überständen 20 µl und vom Standard HMW 4 µl bei der SDS-PAGE aufgetragen, 1 u. 6 = HMW Standard, 2 - 5 Aufschluß von Pellets ohne PIC, 7 u. 8 Überstände, 9 u. 10 Pellets mit PIC.

4.9.4.3 Immunologische Detektion des Proteins mit Hilfe von Antikörpern gegen His-Reste

Durch die Verwendung des pET 24 a (+) Vektors war es durch den Einsatz eines Anti-His-Antikörpers möglich, das Vorhandensein der sechs N-terminalen Histidinen am

hergestellten Protein zu überprüfen. Für die Detektion des rekombinanten, mit einem Histidin-Epitop modifizierten Proteins wurde der monoklonale peroxidase-konjugierte Antikörper Anti-His₆ (Kapitel 2.3) verwendet. Das Western-Blot-Verfahren wurde folgendermaßen modifiziert:

Nach der SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.2) und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Kapitel 2.2) wurde die Membran ÜN mit 5 % Magermilchpulver (w/v) und 0,02 % Tween 20 (w/v) behandelt. Die Membran wurde dann mit 100 mU/ml Anti-His₆-Peroxidase in Blockierungslösung für 1 h bei 20 °C inkubiert. Dann wurde die Membran 3 x für jeweils 5 min mit 50 ml 1x PBS gewaschen und anschließend gemäß Standardprotokoll mit dem Chemilumineszenz-Substrat detektiert.

In Abbildung 31 ist der Nachweis des rekombinant hergestellten Polymalataseproteins (Fragment 5) nach SDS-Page und immunologischer Detektion mit dem Antikörper Anti-His₆-tag dargestellt. Die angefärbte Bande befindet sich an der Stelle des rekombinant produzierten Proteins. Die Anfärbung mit dem Anti-His₆-tag Antikörper läßt auf das Vorhandensein der N- terminalen 6 Histidin-Aminosäurereste schließen.

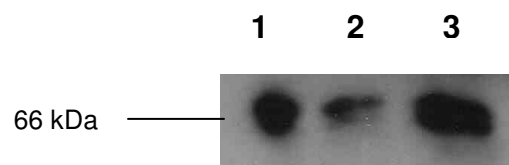


Abbildung 31: 1 - 3 = Rekombinant hergestelltes Polymalataseprotein (Fragment 5) nach SDS-Page und immunologischer Detektion mit dem Antikörper Anti-His₆-tag. Es wurden 20 µl des Pellets in der SDS-Page aufgetragen.

Durch das Vorhandensein des Histidin-Aminosäurerestes war ein Abbau am N-terminus der rekombinanten Polymalatase (Fragment 5) wenig wahrscheinlich.

4.9.5 Versuche zur Aktivierung von rekombinant hergestellter Polymalatatase (Fragment 5)

Wie im Kapitel 4.9 bereits beschrieben, wich das Molekulargewicht des nach SDS-PAGE gefundenen Proteins von der über die Aminosäuresequenz berechneten ab. Da sich aber das rekombinante Protein mit dem polymalataspezifischen Antikörper p97 N anfärben ließ und auch die N-terminalen Histidin-Amminosäurereste vorhanden waren, war wahrscheinlich, daß ein Großteil des Polymalatasegens translatiert worden war. Hier sollte untersucht werden, ob die rekombinant hergestellte Polymalatatase Aktivität zeigte oder Polymalatataseaktivität induziert werden konnte.

4.9.5.1 Aktivitätsmessungen von Polymalatatase (Fragment 5)

Sowohl mit dem Pellet als auch mit dem Überstand wurde ein Aktivitätstest für die Polymalatatase (Fragment 5) durchgeführt (Kapitel 3.9.4). Dabei wurden 100 µl Suspension des Pellets und 100 µl des Überstandes verwendet. Das Pellet wurde in 200 µl Aufschlußpuffer (Kapitel 2.6.7) verdünnt.

Mit einem Ansatz wurde sofort und mit einem zweiten Ansatz nach Inkubation für 1 h bei 20 °C ein Polymalatataseaktivitätstest durchgeführt. Dabei zeigte sich weder im Pellet noch im Überstand Polymalatataseaktivität.

Das Pellet löste sich ohne Schwierigkeiten im Aufschlußpuffer. Deshalb war die Identität als Conclusion-Body wenig wahrscheinlich. Die Natur des Pellets wurde nicht weiter untersucht; es ist möglich, daß die Polymalal bindende Eigenschaft hiermit in Zusammenhang steht.

4.9.5.2 Aktivierungsversuche von Polymalatase (Fragment 5) mit Hilfe der Membranfraktion

Da das produzierte Protein keine Aktivität zeigte, wurde mit verschiedenen Substraten eine Aktivierung versucht. Dazu wurden zu 100 µl Suspension des Pellets mit 200 µl Aufschlußpuffer (Kapitel 2.6.7) verdünnt und mit 40 µl der Membranfraktion (P2) des fraktionierten Zellaufschlusses (Kapitel 3.3.2.2) versetzt. Im Anschluß wurde der Ansatz für 1 h bei 20 °C inkubiert. Bei 0, 20, 40 und 60 min wurden 20 µl Probe entnommen und ein Aktivitätstest durchgeführt. Dabei konnte keine Aktivität festgestellt werden.

4.9.5.3 Aktivierung von Polymalatase (Fragment 5) durch Mg-ATP

In Kapitel 4.5 sind die Versuche zur Aktivierung der Polymalatase aus *Physarum polycephalum* mit Mg-ATP beschrieben. Bei Versuchen zur Aktivierung der Polymalatase im Kulturüberstand konnte zwar keine eindeutige Aktivierung festgestellt werden, aber es lagen Hinweise für die Aktivierung von Polymalatase durch Mg-ATP vor (Karl, 1999). Deshalb wurde der Versuch wie in Kapitel 4.9.10.2 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurden die Membranfraktion durch 5 mM Mg-ATP ersetzt und die Proben wurden alle 10 min während der Inkubation entnommen.

Als Kontrolle wurde das Pellet ohne die Zugabe von 5 mM Mg-ATP inkubiert. Aus Abbildung 32 ist die Aktivierung der Polymalatase (Fragment 5) durch Mg-ATP zu sehen.

Das Pellet als Kontrollansatz ohne Mg-ATP zeigt während der Inkubation keine signifikante Zunahme der Aktivität. Beim Ansatz mit Mg-ATP ist bei Beginn der Inkubation (0 min) die Aktivität etwas höher als beim Kontrollansatz, steigt bis etwa 20 min an und fällt dann wieder etwas ab.

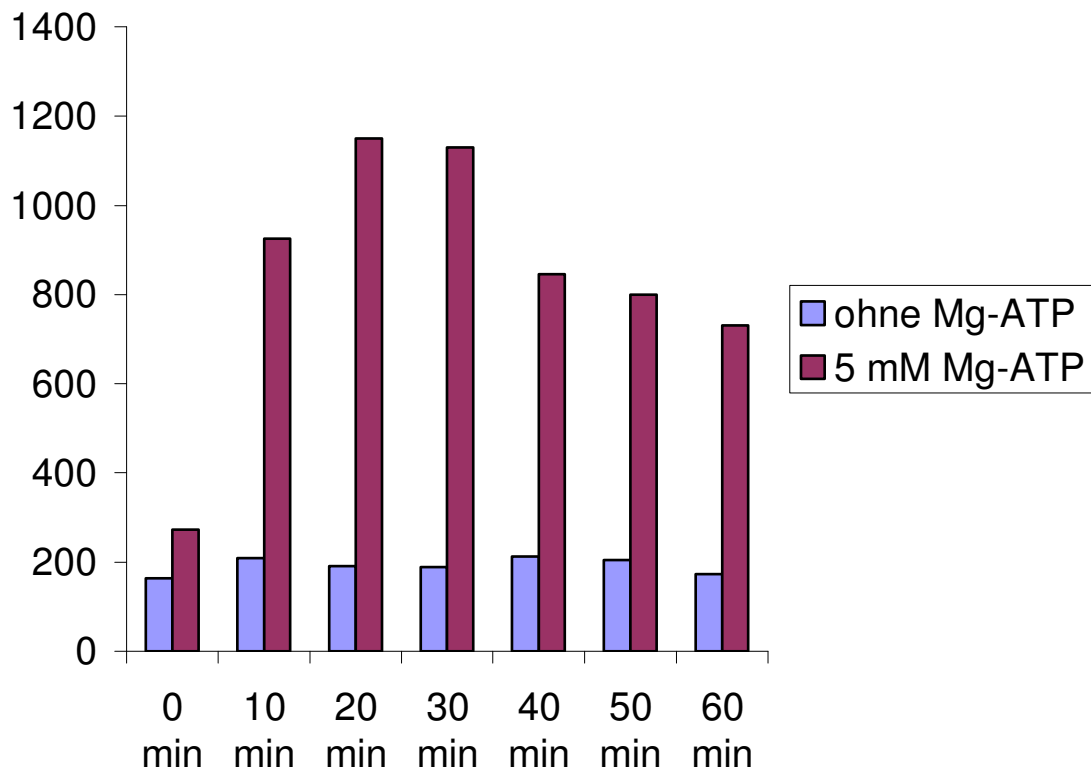


Abbildung 32: Aktivierung der rekombinant hergestellten Polymalatase mit 5mM Mg-ATP. Es wurden 100 μ l Pellet mit 200 μ l Aufschlußpuffer verdünnt. (Kapitel 2.6.7)

4.10 Bestimmung des Polymalatgehalts von Makroplasmodien nach Knock-down des Polymalatase-Gens

4.10.1 Vorbemerkung

Mit der Methodik der RNA-Interferenz durch Injektion von dsRNA und siRNA in Makroplasmodien konnten die Auswirkungen der Suppression der Polymalatase-Expression untersucht werden.

Nach der in vitro Transkription von dsRNA und siRNA und Injektion von 10 µl dsRNA (0,1 µg/µl) bzw. 10 µl siRNA (0,1 µg/µl) (Kapitel 2.9) in 22 h alte Makroplasmodien des Stammes M₃CVII wurden die Kulturen für 24 h bei 24 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde 10 µl DEPC-H₂O injiziert und ebenfalls unter obigen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Makroplasmodien abgeschabt, mit flüssigen Stickstoff gefroren und bei –80 °C gelagert.

Der RNAi-Effekt wurde in einer semiquantitativen RNA-Bestimmung der mRNA der Polymalatase mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Als Bezug diente die mRNA von Aktin. Dazu wurde die Gesamt-RNA isoliert, Revers transkribiert und die erhaltenen cDNAs semiquantitativ im Light Cycler gemessen.

Danach wurde eine Suppression der mRNA für Polymalatase von Makroplasmodien zu 90 % durch Injektion von dsRNA und zu 82 % durch die Injektion von siRNA beobachtet (Haindl, 2004).

4.10.2 Polymalatgehalt der Membranfraktion nach Injektion von dsRNA Polymalatase

Im folgenden Versuch wurden die Auswirkungen der Suppression der Expression von Polymalatase auf den Polymalatgehalt untersucht. Die Proben wurden von Markus Haindl gestellt und lagen als Zellen im gefrorenen Zustand vor (Kapitel 4.10.1).

Mit allen Proben wurde ein fraktionierter Zellaufschluß (Kapitel 3.3.2.2) durchgeführt. Der Polymalatgehalt (Kapitel 3.9.3) wurde in der Membranfraktion P2 bestimmt. In Abbildung 33 ist der Polymalatgehalt der Membranfraktion von Makroplasmodien nach Injektion von dsRNA (Kapitel 2.9) zu sehen. Als Vergleich wurde der Polymalatgehalt von P2 bei Makroplasmodien nach Injektion von DEPC-H₂O und unspezifischer RNA bestimmt.

Der Vergleich der verschiedenen Proben bezüglich des Polymalatgehalts zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Probe nach Suppression des Polymalatase Gens und den Kontrollen. Der Polymalatgehalt betrug bei DEPC-H₂O 100 ± 18 µg Malat/h x mg Protein, bei unspezifischer RNA 95 ± 21 µg Malat/h x mg Protein und bei dsRNA 92 ± 16 µg Malat/h x mg Protein.

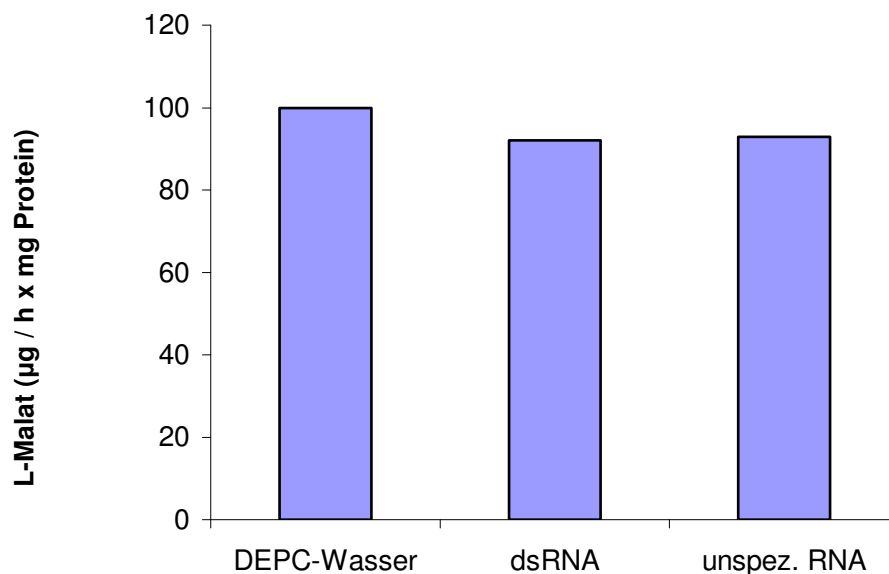


Abbildung 33: Polymalatgehalt in µg Malat/h x mg Protein von Makroplasmodien nach Injektion mit DEPC-Wasser, dsRNA (Polymalatase) und unspezifischer RNA.

Von allen Proben wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Malatmenge wurde in Bezug zu 1 mg Protein gesetzt.

4.10.3 Export von Polymalat nach Injektion von siRNA

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Export von Polymalat und der Polymalatase zu untersuchen, wurden wie in Kapitel 4.10.1 beschrieben, die Makroplasmodien des Stammes M₃CVII mit 10 µl siRNA injiziert (0,1 µg/µl) (Kapitel 2.9). Als Änderung wurden die Makroplasmodien auf Folie angezogen, um sie nach der Injektion und Inkubation für 22 h für den Exportversuch auf Flüssigmedium zu übertragen (Kapitel 4.4). Daraufhin wurde der Test auf Polymalat durchgeführt (Kapitel 3.9.3). Aus Abbildung 34 ist ersichtlich, daß nach der Suppression des Polymalatase-

Gens kein steigender Export von Polymalat mehr zu erkennen ist. Als Vergleich wurde der Export bei Makroplasmodien ohne Injektion von siRNA mit aufgetragen.

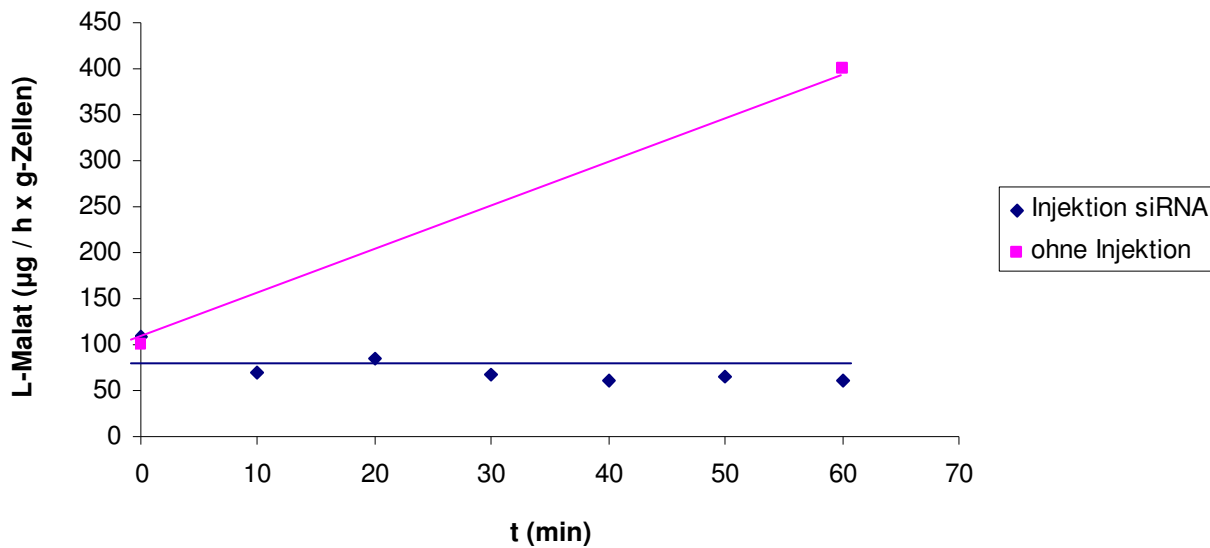


Abbildung 34: Export von Polymalat ohne Injektion und nach Injektion von siRNA Polymalatase. Es wurden Makroplasmodien des Stammes M₃CVII verwendet.

5 Diskussion

5.1 Einführende Bemerkung

Physarum polycephalum gehört zu den echten Schleimpilzen. Diese bilden neben Sporen und Amöben auch sogenannte Plasmodien aus. Diese Riesenzellen beherbergen Milliarden von Zellkernen, die nicht durch Zellwände getrennt sind und sich im Zellzyklus synchron teilen. Das Plasmodium zeichnet sich durch eine Reihe sehr interessanter Eigenschaften aus. Ein Aspekt ist ein Biopolymer, die Poly-Äpfelsäure (PMLA), die nur von diesem Zelltyp hergestellt wird (Fischer, Erdmann et al., 1989). PMLA stellt ein Polyester von L-Malat dar, der durch Verknüpfung der Hydroxylgruppen mit der Carboxylgruppe in β -Stellung gebildet wird. Unter physiologischen Bedingungen liegt PMLA als hochgradiges Polyanion vor. Es erfüllt wahrscheinlich die Funktion eines molekularen Transporters, indem es das Nukleinsäurerückgrat imitiert (Holler et al., 1992), der der Aufrechterhaltung der zellulären Gleichverteilung nukleärer Proteine innerhalb der Riesenzelle (Angerer & Holler, 1995) dient. Das Polyanion wird zellulär nicht abgebaut, sondern es wird kontinuierlich synthetisiert und im Überschuß an das Kulturmedium abgegeben. Dort wird es von einer Depolymerase (Polymalatase) in seine Bausteine, L-Malat, hydrolytisch gespalten. Die Polymalatase liegt konzentriert als enzymatisch inaktive Form im Cytoplasma vor und wird nur zu einem sehr geringen Anteil in das Kulturmedium abgegeben. Im Cytoplasma bindet Polymalatase an Polymalat und funktioniert als Adaptermolekül für die Interaktion mit bestimmten, bisher noch nicht charakterisierten Proteinen, u.a. wird ihr auch eine Funktion im Transport zu den Zellkernen zugeschrieben (Karl & Holler, 1998).

Der Export von Polymalat über die Zellmembran stellt einen weiteren wichtigen Aspekt dar, bei dem Polymermoleküle mit sehr großer Molmasse (mehr als 300000) sezerniert werden. Die Möglichkeit einer Polymalataseabhängigkeit des Transports von Polymalat wurde in vorliegender Arbeit untersucht.

5.2 Einfluß unterschiedlicher Beleuchtungen auf den Export von Polymalat und Polymalatase bei Mikroplasmodien

Der Vergleich des Exports von Polymalat und Polymalatase zeigte ein paralleles Verhalten in der Exportkinetik bezüglich Temperatur, pH-Wert, Hell/Dunkel und Licht verschiedener Wellenlänge (Brandmaier, 2003).

Die Untersuchungen zum parallelen Verhalten des Exports wurden um den Wechsel der Beleuchtung von Grün auf Weiß bei Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII erweitert. Dabei wurde auch überprüft, wie schnell Hemmung des Polymalatexports einsetzte und ob die Hemmung reversibel war.

Zuvor wurde durch die Bestimmung der Lebendzellzahl und durch die Messung des gelben Farbstoffes eine Schädigung der Zellen durch die Bestrahlung mit Weißlicht während des Untersuchungszeitraumes ausgeschlossen.

Der Export von Polymalat wurde während 30 min Inkubation mit Grünlicht bestimmt. Die erhaltenen Werte stimmten mit der erwarteten Exportrate bei Grünlicht überein. Nach Wechsel der Beleuchtung auf Weißlicht wurde Polymalat nicht mehr exportiert. Die Hemmung trat innerhalb von 2 bis 4 min auf. Die Hemmung konnte nicht wieder durch Bestrahlung mit Grünlicht aufgehoben werden.

Des Weiteren wurde der Einfluß verschiedener Beleuchtung auf den Export von Polymalat des Stammes LU 887 untersucht. Der Stamm LU 887 unterscheidet sich von Stamm M₃CVII durch einen verringerten Export von Polymalat und Polymalatase und durch das weitgehende Fehlen des gelben Farbstoffes.

Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Export mit unterschiedlichen Beleuchtungen gemessen. Die Bestrahlung mit Rotlicht zeigte keine Veränderung im Export. Im Gegensatz zu Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII zeigte bei Mikroplasmodien des Stammes LU 887 die Bestrahlung mit Lilalicht eine Hemmung. Die Gründe für die Hemmung sind unbekannt. Einmal könnte es eine Schutzfunktion ausüben. Das läßt vermuten, daß das gelbe Pigment offenbar einen Sensor zur Auslösung des Synthese-Stops enthält. Diese Vermutung erscheint sinnvoll, da *Physarum polycephalum* in seinem natürlichen Lebensraum ebenfalls das Licht meidet und ein

kurzzeitiger Schutz gegen Strahlung notwendig sein könnte. Auch der Befund, daß Weißlicht den Polymalatexport von Mikroplasmodien des Stammes M3CVII sehr schnell hemmt, läßt auf eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit dieses Organismus schließen. Eine andere Funktion könnte die der Induktion bestimmter Differenzierungsvorgänge darstellen. Diese Annahme paßt auch zu der Beobachtung, daß der Abbruch nach Weißlichtbestrahlung nicht sofort umkehrbar war. Wahrscheinlich bedeutete Weißlicht ein Signal, mit dem eine Differenzierung unwiderruflich induziert war, wie etwa die Differenzierung zur Sporulation belegt (Marwan, 2003).

Die Stämme M3CVII und LU 887 unterscheiden sich nicht nur in ihrem Verhalten gegen Licht, sondern auch in ihrem Export von Polymalat. Es wurde überprüft, ob sich die beiden Stämme hinsichtlich ihres Malatgehalts unterscheiden. Dazu wurde sowohl der Protein- als auch der Malatgehalt beider Stämme bestimmt. Hinsichtlich des Proteingehalts war zwischen beiden Stämmen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dabei stimmten die ermittelten Werte für den Proteingehalt sowohl in ihrer subzellulären Verteilung in den verschiedenen Fraktionen als auch in ihrer jeweiligen Konzentration mit früheren Untersuchungen überein.

In Bezug zum Malatgehalt unterscheiden sich beide Stämme. Der Malatgehalt des Stammes M3CVII ist mit 20,0 µg Malat/mg Protein ungefähr doppelt so groß wie der Malatgehalt des Stammes LU 887 mit 11,6 0 µg Malat/mg Protein. Da aber die gelben Mikroplasmodien des Stammes M3CVII etwa um den Faktor 7,5 mehr Polymalat exportieren als die weißen Mikroplasmodien des Stammes LU 887, läßt sich aufgrund des geringeren Malatgehalts der verringerte Export von Polymalat bei weißen Mikroplasmodien nicht erklären.

5.3 Untersuchungen mit dem monospezifischen Antikörper gegen Polymalatase

Untersuchungen zum Nachweis der Polymalatase mittels immunologischer Detektion waren in früheren Versuchen schwierig. Der Grund hierfür war, daß die Spezifität

einiger Chargen des vor 10 Jahren hergestellten Antikörpers gegen die Polymalatase sehr gering waren. So fanden sich neben den erwarteten Banden bei 68 kDa im Außenmedium und den 97 kDa nach Zellaufschluß in der Membranfraktion auch andere Banden mit unerwarteten Größen, wie etwa bei 45 kDa und 200 kDa.

Auch war die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen nicht gewährleistet, da bei gleichen Versuchen und Versuchsbedingungen jeweils Banden mit variierenden Molmassen immunologisch nachgewiesen wurden. Mit Hilfe des neuen Antikörpers konnte intrazellulär eindeutig eine 97 kDa große Form nachgewiesen werden. Im Außenmedium hingegen war eine 68 kDa große Polymalatase vorhanden.

Mit allen neuen Antikörpern gegen Polymalatase konnte auch der Zusammenhang zwischen der Polymalatmenge im Außenmedium und der Polymalatase in der Membran während der Anzuchtphase näher betrachtet werden. Dabei stellte sich heraus, daß Polymalatase in der Membranfraktion nur in 2 Tage alten Mikroplasmodien des Stammes M₃CVII, nicht aber in 8 Tage alten Mikroplasmodien vorlag.

Dieses Ergebnis stimmte mit früheren Arbeiten (Ledl, 2001) überein. Dort konnte gezeigt werden, daß mit zunehmender Kultivierungsdauer die Polymalatmenge im Kulturüberstand abnahm und die Polymalataseaktivität im Kulturüberstand zunahm, während sich die Proteinmenge in den Mikroplasmodien nach Zellaufschluß im betrachteten Zeitraum verringerte.

Die Beobachtung, daß zwar in Ü₂, nicht jedoch in Ü₁ die Polymalatase angefärbt wurde, ist auf den ersten Blick nicht logisch. Wenn die Polymalatase im Cytosol Ü₂ vorliegt, dann müßte sie eigentlich in der Cytoplasma und Membranfraktion Ü₁, die eine Vorstufe von Ü₂ im fraktionierten Zellaufschluß darstellt, ebenfalls vorhanden sein. Eine Möglichkeit der Erklärung für diese Beobachtung ist, daß die Polymalatase mit zunehmender Dauer des fraktionierten Zellaufschlusses von der Membran abdissoziiert und ins Cytosol gelangt. Aus diesem Grund findet man Polymalatase in Ü₂, nicht aber in Ü₁.

5.4 Herstellung der rekombinanten Polymalatase

Mit der Aufdeckung der Nukleotidsequenz von Polymalatase ergab sich die Möglichkeit, das Protein rekombinant herzustellen. Dabei erschien der Einsatz zweier verschiedener Expressionssysteme als sinnvoll. Zum einen die Klonierung des Polymalatasegens in den Hefeexpressionsvektor pAM 81 und anschließender Expression im Hefestamm AH 22. Der Vorteil dieses Weges wäre, daß das hergestellte Protein wahrscheinlich ähnlich wie natürliche Polymalatase glykosyliert gewesen wäre.

Die andere Möglichkeit stellte die Expression in *E. coli* dar. Dazu wurde das Polymalatase-Gen in den *E. coli* Expressionsvektor peT 24 a (+) kloniert. Das erhaltene Protein war nicht glykosyliert.

Zuerst wurde das Polymalatase-Gen aus *Physarum polycephalum* isoliert. Dazu wurden die *Physarum* Zellen lyophilisiert und die Gesamt-RNA gewonnen. Anschließend wurde die Gesamt-RNA in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase umgeschrieben.

Dann wurde das Polymalatase-Gen mittels PCR und verschiedenen Primerpaaren amplifiziert und sollte dann in einem ersten Schritt in den pUC 19-Vektor eingebracht werden. Dabei zeigte sich aber, daß alle Klonierungsversuche mit dem Primerpaar PMLA SPFY1 und PMLA RV YE1 fehlschlagen. Klonierungen gelingen oft in *recA*⁻ Stämmen, während sie in Stämmen ohne diese Deletion nicht möglich sind. Diese Erklärungsmöglichkeit für das Mißlingen der Klonierung mit dem Primerpaar PMLA SPFY1 und PMLA RV YE1 scheidet aber aus, da es bei der Klonierung keine Rolle spielte, ob der zur Transformation verwendete *E. coli* -Stamm *recA*⁻, wie DH 5 α , oder lediglich *recA*1 wie DH 10 B waren. Auch durch den Einsatz eines Hefeexpressionsvektors war die Transformation in die *E. coli* -Stämmen nicht erfolgreich.

Bei Versuchen mit Fragmenten des Polymalatase-Gens fand man aber Vektoren mit Inserts in der richtigen Größe. Da für eine erfolgreiche Expression das Stop-Codon notwendig war, wurde ein Klonierungsversuch mit einem längeren Fragment und den Primern PMLA FE Y1 und RV 11 versucht. Auch hier fanden sich Vektoren mit dem richtigen Insert. Das führte zu der Schlußfolgerung, daß offenbar die Fragmente mit den Primern SPFY1 und PMLA

RV YE1 nicht klonierbar waren, längere und kürzere Fragmente aber schon. Das läßt vermuten, daß die nicht kodierbaren Fragmente Strukturen einnehmen, die eine Ligation mit dem Vektor verhindern, während kürzere und längere Abschnitte offenbar eine Ligation erlauben.

Nach der erfolgreichen Klonierung dieses Fragments war eine Einbringung in den *E. coli*-Expressionsvektor peT 24 a (+) möglich. Mit Hilfe dieses Expressionssystems wurde ein Protein mit anhängenden Histidin-Resten hergestellt. Berechnungen aus der Aminosäuresequenz ergeben ein Protein, eine Molmasse mit der Größe von 74 kDa. Die Größe des Fragments stimmt nicht mit der intrazellulär gefundenen Polymalatase oder mit der ins Außenmedium sezernierten Polymalatase überein. Intrazellulär findet sich eine Polymalatase mit der Größe von 97 kDa, deren Größe sich nach Deglykosylierung um etwa 10 kDa verringert. Die sezernierte Polymalatase weist eine Größe von etwa 68 kDa auf. Beide Formen der natürlichen Polymalatase zeigen Aktivität (Karl, 1999).

Beim rekombinant hergestellten Fusionsprotein findet sich experimentell eine Größe von etwa 66 kDa anstatt 74 kDa. Das His-Tag war vorhanden, also war eine Verkürzung am N-Terminus des Proteins wenig wahrscheinlich.

Die Ursachen der Verkürzung könnten unvollständige Transkription, Translation oder posttranslationaler Proteaseabbau sein. Während die Untersuchung zu den ersten beiden Möglichkeiten noch ausstehen, konnte durch den Vergleich der Größe des rekombinant hergestellten Proteins mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitorcocktail ein Abbau durch Proteasen als wenig wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Eine ganz andere Erklärung wäre die, daß das rekombinante Protein in der SDS-PAGE ein ungewöhnliches Laufverhalten zeigt, und die gefundenen 66 kDa in Wirklichkeit nicht der wahren Molmasse entsprechen. Zur Klärung dieser Frage ist eine massenspektroskopische Bestimmung vorzuschlagen, die nach Aufreinigung der rekombinanten Polymalatase erfolgen müßte.

5.5 Zusammenhang zwischen Polymalatexport und Polymalatase

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fragestellung untersucht werden, inwieweit der Export von Polymalat von Polymalatase abhängig war. Folgende Ausführungen fassen die gemachten Beobachtungen zusammen und mögliche Erklärungen werden diskutiert:

1. Polymalat und Polymalatase werden beide ins Kulturmedium sezerniert. Es wurde gezeigt, daß es sich um einen Export handelt, und nicht um eine Schädigung der Zellen.
2. Bei Versuchen mit dem neuen Antikörper konnte eine 97 kDa-Form intrazellulär und eine 68 kDa-Form im Kulturmedium nachgewiesen werden. Beobachtungen bei Zellaufschlüssen und anschließenden Western-Blots zeigten, daß sich Polymalatase überwiegend in der Membranfraktion und nicht im Cytosol befand. Die Möglichkeiten des Zustandekommens dieses Befundes sind in Kapitel 4.7.1 behandelt. Weitere Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die 68 kDa-Form von Polymalatase ein proteolytisches Abbauprodukt der 97 kDa-Form darstellt, das an der äußeren Zellmembran entsteht.
3. Wie in Kapitel 5.2 bereits diskutiert, zeigen sowohl Polymalat als auch Polymalatase bei Mikroplasmodien paralleles Verhalten in der Exportkinetik bezüglich Temperatur, pH-Wert und Licht verschiedener Wellenlängen.
4. Untersuchungen zeigten, daß bei gelben Makroplasmodien die Aktivität der Polymalatase innerhalb der ersten 15 min mit 240 Units/g x h in etwa die gleiche Aktivität erreicht werden kann, wie bei Mikroplasmodien desselben Stammes. Ab 18 min fiel die Aktivität der Polymalatase sowohl bei Mikroplasmodien als auch bei Makroplasmodien.
Weiße Makroplasmodien zeigten im Meßzeitraum keine Zunahme der Aktivität. Nach Injektion von 400 µg Polymalat ergab sich bei gelben Makroplasmodien keine

Zunahme bei Export der Polymalatase im Kulturmedium, während bei weißen Makroplasmodien die Exportrate auf ein vergleichbares Niveau wie bei gelben Makroplasmodien anstieg. Weiße Makroplasmodien verfügen naturgemäß über weniger Polymalat und zeigen einen geringeren Export der Polymalataseaktivität. Das Injektionsexperiment zeigt, daß die Aktivität von Polymalatase im Kulturüberstand vom endogenen Polymalatgehalt abhängt. Einen eindeutigen Rückschluß des Mechanismus der Abhängigkeit des Exports von Polymalat von der Polymalatase läßt dieser Befund nicht zu, da Polymalataseaktivität im Kulturmedium zusätzlich noch die Aktivierung von Polymalat-Precursor vermutlich noch an der Membranseite von Plasmodien benötigt. Endogene Polymalatase ist inaktiv (Karl, 1999).

5. Zur Aktivierung der Polymalatase sind folgende Sachverhalte bekannt: Polymalatase wird, wie schon erwähnt, an das Außenmedium sezerniert und anschließend von einem über den Golgi-Apparat exportierten Faktor aktiviert. Es wurde mit Hilfe von Proteasehemmern untersucht, ob es sich bei diesem Faktor um eine Protease handeln könnte. Dabei zeigte sich, daß mit Proteasehemmer im Kulturüberstand keine Aktivierung der Polymalatase mehr festgestellt werden konnte, der Polymalatexport aber unbeeinflusst blieb.

Die Beobachtung der Hemmbarkeit der Aktivierung könnte auch erklären, warum Aktivierung von Polymalatase aus *Phsarum polycephalum* bei unterschiedlichen Bedingungen, wie zum Beispiel in Gegenwart von Mg-ATP, nicht möglich waren, da alle Zellaufschlüsse in Gegenwart von Proteasehemmer durchgeführt wurden. Offensichtlich ist die proteolytische Aktivierung nicht für den Polymalatexport notwendig.

6. Die Aktivierung der rekombinant hergestellten Polymalatase war mit Mg-ATP möglich, da deren Isolierung ohne Proteasehemmer durchgeführt wurde. Die Aktivierung rekombinanter Polymalatase zeigte, daß hierfür Mg-ATP notwendig war. Der genaue Mechanismus und ob Polymalatase-Precursor in Gegenwart von Mg-ATP zur Autoaktivierung fähig ist, steht noch aus.

7. Mit der Methodik der RNA-Interferenz durch Injektion von dsRNA und siRNA in Makroplasmodien konnten die Auswirkungen der Suppression der Polymalatase-expression untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß sich nach Injektion von dsRNA oder siRNA der Polymalatgehalt in der Membranfraktion nicht änderte, aber kein Export von Polymalat nach Suppression des Polymalatasegens mit siRNA mehr stattfand.

Mit diesen Versuchen konnte recht eindeutig die Abhängigkeit des Polymalatexports von Polymalatase gezeigt werden. Für den Export von Polymalat ist Polymalatase also notwendig, diese Funktion muß aber nicht unbedingt mit der hydrolytischen Aktivität von Polymalatabbau zusammenhängen. Die Aktivierung der Polymalatase im Kulturüberstand ist wahrscheinlich nicht nur von Polymalat, sondern auch noch zusätzlich von anderen Faktoren abhängig. Eine Erklärung wäre hierfür, daß die Adapterfunktion von Polymalatase für die Hinführung und Andockung von Polymalat an die Membran notwendig ist. Die Adapterfunktion von Polymalatase war für den Transport von Polymalat in den Kern gezeigt worden (Karl, 2003)

5.6 Ausblick

Die folgenden Versuche sind von Interesse:

1. Aufreinigung des rekombinanten Polymalatasefragments über Nickelsäulen-chromatographie
2. Molmassenbestimmung mit Hilfe von Massenspektroskopie. Klärung der Frage, ob unvollständige Transkription/Translation vorliegt.
3. Mechanismus der Polymalataseaktivierung:
 - 3 a. Autoaktivierung in Gegenwart von Mg-ATP
 - 3 b. Hemmbarkeit der Autoaktivierung durch Proteasehemmer
 - 3 c. Art der Proteasehemmer (Serin-Metallo-Protease usw.)
 - 3 d. Spaltprodukte der aktivierenden Proteolyse

- 3 e. Findet eine Phosphorylierung statt oder ist Mg-ATP nur reversibler Aktivator ([γ - ^{32}P] ATP, Autoradiographie)?
- 3 f. Isolierung und Charakterisierung der Kinase. Liegt Signaltransduktion vor?
4. Untersuchung des aktiven Zentrums von Polymalatase, gezielte Mutationen.
5. Untersuchung der Membranständigkeit unter Verwendung des rekombinanten Enzyms.
6. Welcher Art ist das Präzipitat von Polymalatase-Fragment nach *E. coli*-Aufschluß?
7. Export von Polymalatase. Einfluß von BFA auf die Menge von Polymalatase in der Membran unter Zuhilfenahme des neuen Antikörpers.
8. Untersuchung Polymalatase-interagierender Proteine (PA-Domäne) durch Coprä-precipitation mit neuem Antikörper.
9. Identifikation assoziierender Proteine (Adapter-Funktion von Polymalatase) mit Hilfe von Two-Hybrid-System.
10. Untersuchungen der Regulatorelemente in der Promoterregion des Polymalatase-Gens.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit des Exports von Polymalat von Polymalatase bei *Physarum polycephalum* untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die Exportkinetik um den Einfluß des Lichts verschiedener Wellenlängen zu erweitern und Gründe für den unterschiedlichen Export von Polymalat und Polymalatase bei Mikroplasmodien der Stämme M3CVII und LU 887 zu finden. Ebenso sollte der Einfluß von Proteaseinhibitoren auf den Export von Polymalat und Polymalatase und ein geeignetes Versuchssystem für die Messung des Exports von Makroplasmodien entwickelt werden. Damit sollte auch die Injektion von Polymalat in Makroplasmodien und deren Einfluß auf den Export und die Aktivität der Polymalatase ermöglicht werden. Des Weiteren sollte eine Aktivierung der Polymalatase mit Mg-ATP versucht werden. Die Herstellung eines Antikörpers für die Polymalatase und dessen Anwendung zur eindeutigen Größenbestimmung der Polymalatase innerhalb und außerhalb der Zelle war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Die Herstellung einer rekombinanten Polymalatase mit Hilfe eines *E. coli*-Expressionssystems sollte als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.

Durch die Möglichkeit der Suppression des Polymalatase-Gens durch Injektion von dsRNA und siRNA sollte der Einfluß auf den Export von Polymalat untersucht werden.

Das parallele Verhalten von Polymalat und Polymalatase beim Export wurde um den Einfluß des Lichts verschiedener Wellenlängen erweitert. Dabei zeigte sich, daß beim Wechsel der Beleuchtung von Grün nach Weiß der Export von Polymalat bei Mikroplasmodien des gelben Stammes M3CVII innerhalb von 2 bis 4 min gehemmt wird und diese Hemmung nicht durch erneute Bestrahlung mit Grünlicht wieder aufgehoben werden kann. Bei Mikroplasmodien des weiß pigmentierten Stammes LU 887 wurde der Polymalatexport von Lilalicht gehemmt, während Rotlicht den Export nicht beeinflusste.

Weiß- und gelbe Mikroplasmodien unterscheiden sich zudem hinsichtlich ihres Polymalatexports und in einem wesentlich geringeren Umfang in ihrem Malatgehalt, während der Proteingehalt beider Stämme vergleichbar ist.

Der Export von Polymalat wird durch den Einfluß von Proteasehemmern nicht beeinflusst, während die Aktivität der Polymalatase im Kulturüberstand gehemmt wird.

Es wurde ein geeignetes Versuchsverfahren entwickelt, das die Injektion von Polymalat in Makroplasmodien und dessen Einfluß auf den Export bzw. die Aktivität der Polymalatase im Überstand ermöglicht. Es zeigte sich, daß der Stamm M3CVII ohne Injektion Aktivität im Kulturüberstand zeigte, der weiße Stamm LU 887 nicht. Durch Injektion von Polymalat konnte bei gelben Makroplasmodien keine Aktivitätssteigerung der Polymalatase im Kulturmedium festgestellt werden. Die Polymalatase erreichte jedoch bei weißen Makroplasmodien nach Injektion von Polymalat in etwa die Aktivität wie bei gelben Makroplasmodien.

Mit Hilfe eines neuen Antikörpers wurde die Polymalatase in der Membranfraktion nachgewiesen und deren Größe eindeutig auf 97 kDa bestimmt. Die ins Kulturmedium sezernierte Polymalatase besaß eine Größe von 68 kDa. Während des Wachstums war die Polymalatase in der Membran von zwei Tage alten, nicht jedoch in 8 Tage alten Mikroplasmodien des Stammes M3CVII zu finden.

Mit Hilfe eines *E. coli*-Expressionssystem wurde eine rekombinante Polymalatase hergestellt und mittels Western-Blot nachgewiesen. Die rekombinant hergestellte Polymalatase konnte im Extrakt von *E. coli* mit Mg-ATP aktiviert werden.

Der Einfluß der Suppression des Polymalatase-Gens mittels siRNA bzw. dsRNA auf den Gehalt und den Export von Polymalat konnte gezeigt werden. Nach Suppression des Polymalatasegens wurde der zelluläre Gehalt von Polymalat nicht verändert, jedoch konnte kein Export von Polymalat mehr festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für den Export von Polymalat Polymalatase notwendig ist. Diese muß aber nicht in aktiver Form vorliegen. Bei der Aktivierung von Polymalatase sind neben Polymalat wahrscheinlich noch andere Faktoren beteiligt.

Literaturverzeichnis

- Aldrich, H. C. & Daniel, J. W. (Hrsg.)** (1982 a): Organismus, Nucleus and Cell Cycle. *Cell Biology of Physarum and Didymium*, Band 1. New York.
- Aldrich, H. C. & Daniel, J. W. (Hrsg.)** (1982 b): Differentiation, Metabolism and Methodology. *Cell Biology of Physarum and Didymium*, Band 2. New York.
- Angerer, B. & Holler, E.** (1995): Large complexes of β -Poly(L-malat) with DNA Polymerase, Histones, and other Proteins in Nuclei of Growing Plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Biochemistry* **34**, 14741 - 14751.
- Baldauf, A. L. & Doolittle, W. F.** (1997): Origin and Evolution of slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **94**, 12007 – 12012.
- Birnboim, H. C. and J. Doly** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7** (6), 1513 - 1523.
- Boeke, J. D. & Pickeral, O. K.** (1999): Retroshuffling the genomic deck. *Nature* **398**, 108 - 111.
- Bradford, M.** (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248 – 254.
- Brandmaier, A.** (2003): Export von Polymalat und Polymalatase in Plasmodien vom *Physarum polycephalum*. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

- Cammas, S. et al.** (1993): Natural poly (L-malic acid): NMR shows a poly(3-hydroxy acid)-type structure. *Macromolecules* **26**, 4681 - 4684.
- Daniel, J. W. & Baldwin, H.** (1964): Methods of Culture for Plasmodial Myxomycetes. *Methods in Cell Physiology*, Band 1, 9 - 13. New York.
- Fischer, H. et al.** (1989): An unusual polyanion from *Physarum polycephalum* that inhibits homologous DNA polymerase α . *Biochemistry* **28**, 5219 - 5226.
- Gerard, G. F. & D'Alessio, J. M.** (1993): Methods in Molecular Biology. Enzymes in Molecular Biology. Totowa.
- Gutmann, J. & Wahlefeld, A. W.** (1974): L-(-)-Malat: Bestimmung mit Malat-Dehydrogenase und NAD^+ . Bergmeyer, H. (Hrsg.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band 3, 1632 – 1639. Weinheim.
- Haindl, M.** (2004): Sequenzierung, Charakterisierung und posttranskriptionelle Suppression des β -Poly(L-Malat)-Hydrolase-Gens aus *Physarum polycephalum*. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Hames, B. D. & Rickwood, D. (Hrsg.)** (1990): Gel Electrophoresis of Proteins-A Practical Approach. New York.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557 – 580.
- Heukeshoven, J. V. & Dernick, R.** (1988): Improved silver staining for fast staining in Phast System Development. Units I. Staining of SDS gels Electrophoresis **2**, 28 - 32.

- Holler, E. et al.** (1992): Biological and biosynthetic properties of poly-L-malate. *FEMS Microbiology Reviews* **103**, 109 - 118.
- Holler, E. et al.** (2004): Injection of poly(β -L-malate) into the plasmodium of *Physarum polycephalum* shortens the cell cycle and increases the growth rate. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3805 - 3811.
- Hüttermann A. (Hrsg.)** (1973): *Physarum polycephalum*. Stuttgart.
- Ishigami, M.** (1986): Dynamic Aspects of the Contractile System in *Physarum polycephalum*. Stuttgart.
- Kamiya, N.** (1959): Protoplasmic streaming. *Protoplasmatologia* **8** (3 a), 1 - 199.
- Karl M. & Holler E.** (1998): Multiple polypeptides immunologically related to β -Poly(L-malate) hydrolase (polymalatase) in the plasmodium of the slime mold *Physarum polycephalum*. *European Journal of Biochemistry* **251** (1/2), 405 - 412.
- Karl, M.** (1999): Funktion von β -Poly(L-Malat) und β -Poly(L-Malat)hydrolase in *Physarum polycephalum*. Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Karlson, P. et. al.** (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. New York.
- Korherr, C.** (1993): Versuche zur Reinigung und Charakterisierung der PMA-Hydrolase aus *Physarum polycephalum*. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Korherr, C. et al.** (1995): Poly(β -L-malate) hydrolase from plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Canadian Journal of Microbiology* (Suppl. 1), 192 - 199.

- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 - 685.
- Ledl, A.** (2001): Untersuchungen zur Aktivierung von Polymalatase aus *Physarum polycephalum*. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Lin-Chao, S. et al.** (1992): RNase E is required for the maturation of ssrA RNA and normal ssrA RNA peptide-tagging activity. *Mol. Microbiol.* **6**, 327 – 332.
- Marwan, W.** (2003): Theory of Time-Resolved Somatic Complementation and its use to Explore the Spomlation Control Network in *Physarum polycephalum*. *Genetics* **164**, 105 – 115.
- Mullis, K. et al.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263 - 273.
- Nagata, N. et al.** (1993): Fermentative Production of Poly(β -L-malat acid), a Polyelectrolytic Biopolyester, by *Aureobasidium sp.* *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry* **57**, 638 - 642.
- Rathberger, K. et al.** (1999): Comparative synthesis and hydrolytic degradation of poly(L-malate) by myxomycetes and fungi. *Mycological Research* **105**, 513 - 520.
- Reiter, E.** (2003): cDNA-Sequenzierung und in vitro Transkription/Translation der β -Poly(L-Malat)-Hydrolase. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Richter, M.** (2004): Export von β -Poly(L-Malat) über Assoziation mit β -Poly(L-Malat)-Hydrolase. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

- Sambrook, J. & Russel, D. W.** (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York.
- Sanger, F. et al.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12), 5463 - 5467.
- Schmidt, A.** (1996): Nuclear accumulation and homeostasis of the unusual polymer β -poly-(L-malate) in plasmodia of *Physarum polycephalum*. *European Journal of Cell Biology* **70**, 373 – 380.
- Shimada, K. et al.** (1969): Poly-(l)-malic acid; a new protease inhibitor from *Penicillium cyclopium*. *Biochem Biophys Res Commun* **35** (5), 619 - 624.
- Sitte, P. et. al.** (1998): *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Stuttgart.
- Slatko, B. E.** (1994): Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* **31**, 35 - 45.
- Stryer, L. et al.** (2002): *Biochemistry*. New York.
- Studier, F. A. & Moffat, B. A.** (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189**, 113 – 130.
- Studier, F. A. et al.** (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of clones genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60 – 89.
- Towbin, H. et al.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350 – 4354.

- Trzcinska-Danielewicz, J. & J. Fronk** (2000): SURVEY AND SUMMARY: exon-intron organization of genes in the slime mold *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res* **28** (18), 3411-3416.
- Windisch, C. et. al.** (1992): Production and Degradation of β -Poly (L-malate) in Cultures of *Physarum polycephalum*. *Cell Biology international Reports* **16** (11), 1211 - 1215.
- Yanisch-Perron, C. et al.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103 – 119.

Anhang

Fragment 5 in der cDNA-Sequenz von Polymalataze

```

0001 tatataacat ctttcacact cttctataact gccgtatcag aaatgcacag taggaqtgct
0061 tqtatTTTTg ttttqtgttg qttattgccc tttgttcttg gcacgagtct taqtggcccg
0121 gaacaaacgt tcttcaatct tccggacccc gctcagacca gagagcactt acagtattac
0181 acatcatctc ctcatcttgc aggatcacia agggattatg agacagcagt atatacccat
0241 gacaagtttg tggagtacgg acttttcagat gtcgtaattc acaccagca cgttgtggcg
0301 aatttcccgc tccaaagaga actcgaatta cggaaggcgg atggcacagt gcttttcaca
0361 gctggcctct acgaaccccc tcttgtggag gatccctatg accccgcaga agaccacc
0421 ttcaacatgt tttctggttc cggaacagtt acaaatcgta ttgtctatgc taactacggg
0481 tcaactggacg acttcaacta tttgaaaaat aatggcgtag atcttaaagg agctctagta
0541 cttactcgat atggccctac ctatcgtgga atcaaagcgt tcctggcaga acagtttgga
0601 gccgccgggc ttttgattta ttctgatccg caacaagatg ggtttgatgc cggcgccgaa
0661 caccagtgat atccagaagg aaaatggcgc cctgaactca gtgtacaaag ggggtgtcta
0721 gtatactggc agtactgccc aggaagtcct tcacaagagc gcatgggtct ttgcttagga
0781 gaggagtttg cggacgcaag ccctgccgga aatctctacc ccacaattcc tgtgcttccc
0841 atctcctggg gagatgccta cccattttg caagacatcg ccaacaatcc caacggtctc
0901 gctgcccctt ccacttggca aggagggttg aacttcacat acaaggccgg accaagcgtg
0961 aaccaagttt acctcaacgt ccaaatgaat actaccaaca ctaccatatg gacagtaact
1021 ggaacgttcc gtggccaatc atctaacgag gctgttcttg ttggaaacca cagagacgct
1081 tggggaaaaa gaggttctga tcctagttct ggcacatoca ttttgctcga gatcattcgt
1141 tccttagagt gctcgctaact actaccgcat gggttcctaa gagggatatt tacttcggca
1201 gctgggatgg agaggaatat ggaattatgg gttcgaccac ttggggccga agataatgaa
1261 gtgttcttga aagatactct tatggcttat taaatgttg acattggagc atgtggtcca
1321 ttgctgaata tcagaggaac acctaaactg ttgaacgtca taaaggatgt tgcttcacia
1381 atacctgacc cttcagacag cacgaagaaa ctcacagatt tctggacca cagaccagctc
1441 gtcgttttag gatctggatc tgattttgtc ccgttcattg atttcttggg agttccatca
1501 gtggacttct actacagctc cagccctgga gctaatagag gttaccactc catatatgac
1561 tctttcgcgt ggatggacca attcggagac cccgatata tcaagtccgt tgccttggcg
1621 cgcttgattg gaatccttgc cattcgtttt gctgatgaca tcgtgatccc tctgaacttt
1681 tcgaactacg cgggacaact ccaaacctat ttaacgacaa ttcaacaaca agtggcaact
1741 ggacttccag gaacctacga ctactcacc ctccaaaatg caatcacgca attcaaaacc
1801 gcggcagctg ccattgatgg cgaagcagct tgcgtgcgct ccagtggaag tgcgactggt
1861 tgcacatcag atctgaatga attaaatcgc agattacaaa ttgctgaaag atcctttttg
1921 attaaactca agaccaactc tagtgatgga cttccaaaaa gaaattggca caagcacgtt
1981 gttcaagctg caggaatttt agatggatac ggcgctcaga ttttccagg aattgcgcaa
2041 ggaatagtcg acaataaccc cgcactaatc cagcaacaaa ttggtcgtgc tgctgatacc
2101 atcttgaatg tggtcgaagc ttcttactcc cgcaggatcc aagaaatgag caaactatga
2161 agttacagtt acttgtcctc tttatgtaac aaaccggcaa taaacaattt tgtcccaaaa

```

Start- und Stopcodon sind schwarz hinterlegt, Fragment 5 ohne Schnittstellen für den pET 24 a (+) Vektor ist rosa unterstrichen.

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaften Fakultät III, Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eggehard Holler.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holler, meinem Doktorvater, der mir über die Jahre ein wunderbarer Lehrer war. Er stand mir bei Fragen stets zur Seite und gab mir konstruktive Anregungen für diese Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Oertl möchte ich mich für die Überlassung des Hefeexpressionsvektors und seinem Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Frau Dr. Dönges danke ich für die Überlassung des *E. coli*-Expressionssystems mit den dazugehörigen *E. coli*-Stämmen und Herrn Markus Richter für den Anti-His-Antikörper.

Vielen Dank an alle meine Praktikanten für ihre engagierte Mitarbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Holler, besonders bei Barbara, Hermine und Sonja, möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Unterstützung danken.

Meinen Eltern, Familie Eder und Frau Baumgartner bin ich für die jahrelange Unterstützung sehr dankbar.

Mein größter Dank gilt meiner lieben Freundin Sandra für ihr Vertrauen und für ihre grenzenlose Unterstützung bei allen meinen beruflichen und privaten Projekten. Ohne ihre Hilfe wäre Vieles nicht möglich gewesen. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als in der Arbeit angegebene Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde bisher weder als Zulassungs-, Diplom- oder Doktorarbeit, noch als Teil einer solchen Arbeit einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 06.04.2005

Anton Alexander Brandmaier